

Université de Montréal

**Implication des protéines RECA dans le maintien de la
stabilité du génome des chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*.**

Par
Thierry Vincent

Département de biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales en
vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

Juin 2012

© Thierry Vincent, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
**Implication des protéines RECA dans le maintien de la
stabilité du génome des chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*.**

Présenté par :
Thierry Vincent

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Nikolaus Heveker

.....

Président-rapporteur

Dr. Normand Brisson

.....

Directeur de recherche

Dr. Stéphane Roy

.....

Membre du jury

RÉSUMÉ

La stabilité génomique des organelles de plantes suscite un grand intérêt dans le domaine de la biologie végétale. En effet, plusieurs études récentes suggèrent que ce type d'instabilité génomique pourrait mener à l'isolation de traits intéressants en l'agronomie. Plusieurs protéines sont d'ailleurs déjà été identifiées comme étant impliqués dans le maintien de la stabilité de ces génomes, tels que MSH1, la famille des POLI, OSB1, les protéines Whirly et les Recombinases A (RECA). Le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* encode trois protéines s'apparentant à la Recombinase A bactérienne et qui sont ciblées à la mitochondrie et/ou au chloroplaste, soit RECA1, RECA2 et RECA3. Globalement, ces gènes partagent une similarité de séquence de 61% avec leur homologue bactérien chez *Escherichia coli*. Chez les bactéries ces protéines jouent un rôle essentiel dans la recombinaison homologue et sont impliquées dans la réparation de l'ADN. Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que RECA2 et RECA3 sont nécessaires au maintien de l'intégrité du génome mitochondriale. Toutefois leur contribution à la stabilité du génome chloroplastique ainsi que le rôle de RECA1 restent obscures. Le but de ce projet est donc de déterminer la contribution éventuelle des protéines RECA d'*Arabidopsis* dans la réparation de l'ADN chloroplastique et plus précisément le rôle du gène *RECA1*. Nous énonçons l'hypothèse que les RECA de plantes se comportent effectivement comme leurs orthologues bactériens en étant impliqués dans la recombinaison homologue.

Dans le cadre de ce projet, nous avons tenté d'isoler des lignées mutantes pour chacun des gènes *RECA* d'*Arabidopsis*. En somme, nous avons pu obtenir des lignées convenables pour notre étude que dans le cas du gène *RECA1*. Ces lignées ont été utilisées pour évaluer la contribution de ce gène à la stabilité du génome du chloroplaste. Ensuite, pour étudier la relation épistatique des gènes *RECA1*, *WHY1* et *WHY3*, un croisement des différentes lignées mutantes pour ces gènes a été réalisé. Nous avons ensuite étudié la sensibilité de toutes ces lignées mutantes à la ciprofloxacine, un agent causant des bris double brin exclusivement dans les organelles de plantes. Finalement,

nous avons testé la présence de réarrangements dans le génome du chloroplaste en condition normal ou en présence de stress génotoxique. Nos résultats démontrent que les protéines Whirly et RECA1 sont impliquées dans deux voies de réparation de l'ADN différentes et que les Whirly sont suffisantes pour s'occuper des bris d'ADN double brin en l'absence de *RECA1*. Nous démontrons également que l'absence de Whirly et RECA1 entraîne une forte augmentation de la quantité de réarrangements dans le génome du chloroplaste. De plus nous proposons que la polymérase POLIB est impliquée dans la même voie de réparation que *RECA1*. Finalement nous proposons un modèle pour expliquer nos résultats et impliquons RECA1 dans un mécanisme de réparation d'ADN et aussi un rôle potentiel dans la réplication.

Mots-clés : Whirly, Recombinase A (RECA), *Arabidopsis thaliana*, chloroplaste, génome du chloroplaste, Recombinaison Homologue et ciprofloxacine.

ABSTRACT

The stability of plant organelles genomes elicits a great interest in the domain of plant biology. In fact, numerous studies suggest that genomic instability can lead to the isolation of interesting traits in the field of agronomy. Some factors such as MSH1, the POLI family, OSB1, the Whirly proteins and the Recombinase A (RECA), have already been identified as being implicated in the maintenance of genome stability. The nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* encodes three proteins, *RECA1*, *RECA2* and *RECA3*, that shares a high resemblance with bacterial Recombinase A. They are targeted to the mitochondria and/or to the chloroplast. Globally, these genes share a similarity of sequence of 61% with their bacterial homologue in *Escherichia coli*. In bacteria these proteins play an essential part in homologous recombination and are implicated in DNA repair. In *Arabidopsis*, *RECA2* and *RECA3* have been shown as being essential to maintain the integrity of the mitochondrial genome but their contribution to the stability of the chloroplast as well as the role of *RECA1* remains obscure. The goal of this project is to establish the eventual contribution of the *Arabidopsis* RECA proteins in the repair of chloroplast DNA and more precisely the role of the *RECA1* gene. We propose the hypothesis that plants RECA act in the same fashion as their bacterial orthologues by being implicated in homologous recombination.

Within the framework of this project, we have attempted to isolate mutant lines for each *RECA* gene of *Arabidopsis*. In the end, we were able to obtain appropriate lines for our study only for the *RECA1* gene. These lines were then used to evaluate the contribution of the gene to chloroplast genome stability. Afterwards, in order to study the epistatic relationship between the *RECA1*, *WHY1* and *WHY3* genes, a cross between different mutant lines of these genes was realised. We then studied the sensitivity of all of those mutant lines to ciprofloxacin, an agent causing double stranded breaks exclusively in plant organelles. Finally, we evaluated the presence of rearrangements in the chloroplast genome under normal conditions and under the presence of a genotoxic stress. Our

results show that the Whirly and RECA1 proteins are implicated in two separate pathways of DNA reparation and that the Whirly proteins are sufficient to take in charge DNA double strand breaks generated by the absence of *RECA1*. We also demonstrate that the absence of Whirly and RECA1 causes an increase in the quantity of rearrangements in the chloroplast genome. Furthermore, we propose that the polymerase POLIB is implicated in the same repair pathway as *RECA1*. Finally we propose a model to explain our results and implicate RECA1 in a DNA repair mechanism and propose a role for RECA1 in DNA replication.

Key words : Whirly, Recombinase A (RECA), *Arabidopsis thaliana*, chloroplast, chloroplast genome, Homologous Recombination et ciprofloxacin.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS	xiv
1. INTRODUCTION	1
1.1 Importance de la stabilité génomique chez les plantes	1
1.2 Origine et évolution des organelles de plantes; le chloroplaste et la mitochondrie	2
1.3 Le métabolisme de l'ADN; réplication, recombinaison et réparation	3
1.4 Le BER, NER & MMR dans les organelles d'<i>Arabidopsis</i>	5
1.5 La recombinaison homologue, la Ligation d'extrémités Non homologues et le MMBIR	6
1.6 Les Whirly dans la prévention du MMBIR	10
1.7 Les protéines RECA d'<i>Arabidopsis</i> dans le maintien de la stabilité du génome des organelles	13
1.8 Hypothèse de ce travail	16
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	18
2.1 Plantes et conditions de cultures	18
2.2 Génotypage des lignées mutantes	19
2.3 Détermination de la position des insertions	21
2.4 Isolation d'acides nucléiques	21

2.5 qPCR	23
2.6 Détection des réarrangements génomiques illégitimes du chloroplaste	25
3. RÉSULTATS	26
3.1 Isolement des mutants du gène <i>RECA3</i>	26
3.2 Isolement des mutants du gène <i>RECA1</i>	29
3.3 Caractérisation des mutants du gène <i>RECA1</i>	31
3.4 Interaction génétique entre <i>RECA1</i> et les gènes <i>Whirly</i>	34
3.5 Susceptibilité des mutants <i>RECA1</i> aux dommages à l'ADN	37
3.6 Étude du gène <i>RECA2</i>	42
4. DISCUSSION	44
4.1 Implication de <i>RECA3</i> dans le maintien de la stabilité de la mitochondrie	44
4.2 Implication de <i>RECA2</i> dans le maintien de la stabilité du génome plastidique	44
4.3 Implication de <i>RECA1</i> dans le maintien de la stabilité du génome plastidique	45
4.4 Effet de la ciprofloxacine sur l'ADN chloroplastique des mutants du gène <i>RECA1</i>	47
4.5 <i>RECA1</i> est impliqué dans une voie de réparation différente des protéines <i>Whirly</i>	49
4.6 Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du chloroplaste par les RECA	50
4.7 Maintien de la stabilité du génome du chloroplaste par les <i>Whirly</i>	51
4.8 Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du plastide par les RECA face aux bris d'ADN	53
4.9 Réparation de l'ADN du chloroplaste en l'absence des acteurs <i>Whirly</i> et <i>RECA1</i>	56
4.10 Importance de l'activité RECA dans les tissus réplcatifs	57

4.11 RECA1 et RECA2 dans le maintien de la stabilité génomique des tissus sexuels	57
4.12 RECA1 et POLIB dans le maintien de la stabilité génomique des tissus réplicatifs	58
5. PERSPECTIVES	60
5.1 Stratégies pour l'étude de <i>RECA1</i> et <i>RECA2</i> dans le chloroplaste	60
5.2 Interaction épistatique entre les RECA, les OSB et POLIB	61
5.3 Système de bris inductible; outil d'étude pour la caractérisation des mécanismes de réparation dans les organelles de plantes	62
6. RÉFÉRENCES	xvi
7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES	xxx

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paires d'amorces utilisées en qRT-PCR et génotypage. _____20

Tableau 2 : Paires d'amorces utilisées pour les expériences PCR de MMBIR. ___24

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Voies de la recombinaison homologue.	8
Figure 2 Mode d'action de la ciprofloxacine sur les gyrases et réarrangements de type MMBIR.	12
Figure 3 Mécanismes alternatifs de réplication et de réparation de l'ADN empruntant certaines caractéristiques à la RH.	15
Figure 4 Schéma de la stratégie PCR utilisée pour détecter des réarrangements de type MMBIR.	25
Figure 5 Isolement des mutants <i>recA3-1</i> et <i>recA3-2</i> .	28
Figure 6 Isolement des mutants <i>recA1-1</i> et <i>recA1-2</i> .	29
Figure 7 Effets de la ciprofloxacine sur les différentes lignées mutantes.	32
Figure 8 Recombinaisons illégitimes chez les mutants <i>recA1-1</i> et <i>recA1-2</i> .	33
Figure 9 Isolement du mutant <i>recA1-1</i> x <i>why1why3</i> .	35
Figure 10 Augmentations des recombinaisons illégitimes chez le triple mutant <i>recA1</i> x <i>why1why3</i> .	36
Figure 11 Les recombinaisons illégitimes, sous l'effet de la ciprofloxacine, chez le mutant <i>recA1-1</i> .	39
Figure 12 Les recombinaisons illégitimes, sous l'effet de la ciprofloxacine, chez le mutant <i>why1why3</i> .	40
Figure 13 Les recombinaisons illégitimes, sous l'effet de la ciprofloxacine, chez le mutant <i>recA1-1</i> x <i>why1why3</i> .	41
Figure 14 Les recombinaisons illégitimes sous l'effet de la ciprofloxacine chez le mutant <i>recA1-1</i> x <i>why1why3</i> .	43

Figure 15 Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du plastide par les RECA en réponse aux bris d'ADN. _____ 55

Figure Supplémentaire 1 Emplacement des amorces de MMBIR sur le génome chloroplastique. _____ xxx

Figure Supplémentaire 2 Photographies des lignées *recA1-1*, *recA1-2*, *why1why3* et *recA1-1 x why1why3* à l'âge de 3 semaines après culture sur milieu stérile Murashige-Skoog en présence de concentrations croissantes de ciprofloxacine. _____ xxxi

Figure Supplémentaire 3 PCR semi quantitative de l'expression des gènes *RECA1* et *RECA3*. _____ xxxii

Acronymes

RRR – Replication Recombination Repair – Réplication Recombinaison Réparation

MMBIR – Micro Homology Break Induced Replication – Recombinaison induite par des micro homologies

RH – Homologous Recombination – Recombinaison homologue

KO – Knockout – Knock-out (gène knockout)

KD – Knockdown – Fait référence à une expression atténué (gène knockdown)

RDR/BIR – Replication Dependent Recombination also known as Break Induced Replication – Réplication dépendante de recombinaison

ADN – DeoxyriboNucleic Acid - Acide DésoxyriboNucléique

ARN – RiboNucleic Acid - Acide RiboNucléique

CTAB - Cetyl TrimethylAmmonium Bromide - *Bromure de cétyl-triméthyl-ammonium*

SYBR Green I - N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine

PCR – Polymerase Chain Reaction – Réaction en chaîne par polymérase

ADNc – complementary DNA – ADN complémentaire

Col-0 – Columbia 0 - Écotype d'*Arabidopsis thaliana* utilisé en tant que plante sauvage

Lignée SAIL – Lignée mutante provenant de Syngenta Arabidopsis Insertion Library.

Lignée SALK – Lignée mutante provenant de l'institut SALK.

qRT-PCR – Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction - Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel

PFGE - Pulse-Field Gel Electrophoresis – Électrophorèse sur gel en champ pulsé

MS – Murashige Skoog – Milieu de culture pour plante de type Murashige Skoog

SSB – Single Strand Binding protein – Protéines liant l'ADN simple brin/monocaténaire

OSB – Organelle targeted Single Strand Binding protein - Protéines liant l'ADN simple brin/monocaténaire ciblé aux organelles

MSH1 – MutS Homologue – Homologue de la protéine MutS bactérienne

MMR – MisMatch Repair – Réparation des bases d'ADN mal assorties

TDNA – Transfer DNA – ADN transféré via le plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens (Une large cassette d'ADN transféré à l'intérieur d'un gène peut désactiver ce-dernier) On parle de mutant d'insertion TDNA pour un gène x.

ChIP – Chromatin Immuno Precipitation assay

Remerciements

Beaucoup de personnes sont à remercier pour m'avoir aidé à réaliser ce travail. Jean-Sébastien Parent, surnommé avec affection Gigi a été mon mentor au laboratoire, mon plus grand critique lors de l'écriture de ce mémoire, mon coéquipier au hockey sur glace et un excellent ami. Il m'a largement formé au travail de laboratoire et m'a prodigué plusieurs sages conseils qui me servent encore aujourd'hui. Comme son conseil marqué d'une touche l'humour «*Never trust a machine, machines are evil!*» souligne l'importance de connaître les limites qu'impose une machine dans le cadre d'une expérience.

J'aimerais aussi remercier particulièrement Laurent Cappadocia, Étienne Lepage, Philippe Lampron et Mark Andrew Smith. Les discussions scientifiques que j'ai eues avec vous et les conseils que vous m'avez prodigués m'ont grandement aidé. Un clin d'œil particulier à Laurent pour son conseil «*L'important, c'est que ça marche!*». La morale pour moi ici étant qu'un scientifique qui connaît parfaitement toute la théorie derrière une expérience pourra toujours la faire fonctionner, l'adapter à ses besoins, interpréter ses limites et apprécier ses résultats.

J'en profite aussi pour remercier les membres du laboratoire qui ont rendu mon expérience au laboratoire des plus agréables : Jean-Sébastien, Laurent, Étienne, Éric, Sébastien et aussi Paul Héron du laboratoire du Dr Sygusch.

Je remercie aussi chaudement le Dr Brisson pour m'avoir donné une chance dans son laboratoire et pour sa tolérance face à mes blagues qu'il trouvait généralement fades. Le Dr Brisson s'est révélé être un excellent pédagogue et je lui exprime toute ma gratitude.

Finalement j'aimerais remercier ma copine Flavie et ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes projets. Merci!

Introduction

Importance de la stabilité génomique chez les plantes

Les dommages à l'ADN menacent constamment l'intégrité du génome et les conséquences de ces dommages sont potentiellement létales pour l'organisme. L'une des formes les plus cytotoxiques des dommages à l'ADN est le bris double brin qui fragmente le génome. L'échec à réparer ces lésions peut causer la perte d'information génétique ce qui compromettra les cellules filles qui hériteront d'information génétique incomplète ou délétère (10, 50). Les cancers chez l'humain sont d'ailleurs souvent le résultat direct d'instabilités génomiques (97). Les bris double brin peuvent être le résultat d'une variété de stress génotoxique incluant le rayonnement ionisant, les agents chimiques ainsi que la digestion endonucléolytique de différents enzymes. Néanmoins, une large portion des bris double brin est causée par l'effondrement des fourches de réplication qui rencontrent un bris simple brin sur le brin direct ou indirect de la fourche répliquative (51). Les protéines impliquées dans la réplication, la recombinaison et la réplication (RRR) (voir Acronymes) de l'ADN ne sont pas infailibles et permettent un nombre limité de mutations et de réarrangements à l'ADN de sorte à ne pas empêcher l'évolution des organismes. Les études génétiques ont établi que les mutations des protéines impliquées dans la RRR entraînent souvent une plus grande instabilité génomique chez l'organisme concerné (98). La majorité de la recherche a cependant été effectuée sur le génome bactérien ou bien le génome nucléaire des eucaryotes, laissant le maintien de la stabilité des organelles un sujet relativement inexploré (10, 105-106). Les organelles représentent donc une nouvelle frontière dans la recherche fondamentale. En effet, chez les plantes, l'information génétique est partagée entre trois compartiments : le noyau, la mitochondrie et le chloroplaste. La plante doit donc assurer le maintien de la stabilité génomique dans trois compartiments différents. La perte d'information génétique dans les chloroplastes ou les mitochondries peut s'avérer aussi fatale pour la plante que la perte d'information génétique au noyau (10). Il a d'ailleurs été démontré chez *Arabidopsis thaliana* qu'un stress appliqué exclusivement à l'ADN des organelles engendre des effets délétères sur la plante (12).

Origine et évolution des organelles de plantes; le chloroplaste et la mitochondrie.

Pour comprendre le métabolisme de l'ADN des deux organelles de la plante, il est essentiel de se pencher d'abord sur leur origine. En effet, l'acquisition des organelles représente deux événements tournants de l'évolution qui ont permis l'émergence du groupe phylogénétique des plantes. Le premier événement, l'acquisition de la mitochondrie, s'est fait lorsqu'une cellule, ancêtre de tous les eucaryotes, phagocytosa une protéobactérie capable de respiration (84-92). Ces deux organismes partagèrent une existence symbiotique et, au cours de l'évolution, la cellule phagocytée devint la mitochondrie. Les mitochondries sont aujourd'hui le siège de la production d'ATP dans les cellules eucaryotes. Le principe décrit ici est celui de l'endosymbiose et il a été proposé il y a plus d'une centaine d'années, mais n'a été confirmé qu'au cours des années soixante (82-83). C'est selon le même principe que le deuxième événement tournant de l'évolution eut lieu, l'acquisition du chloroplaste, retrouvé aujourd'hui chez les algues et les plantes (86-88). Les chloroplastes sont des organelles contenant de la chlorophylle et étant responsables de la photosynthèse dans une cellule.

Des études phylogénétiques ont plus tard démontré que la mitochondrie et le chloroplaste ont respectivement pour origine une α -protéobactérie (84-85) et une cyanobactérie (88-92). Les génomes des deux organelles modernes des plantes sont très petits en taille et peuvent encoder moins d'une centaine à plus de 200 gènes. C'est particulièrement peu si on considère le génome d'une α -protéobactérie moderne qui contient plusieurs milliers de gènes. Cette différence résulte de la migration d'une grande partie du génome des organismes d'origine vers le noyau. En conséquence, la majorité des protéines mitochondriales et chloroplastiques est encodée par le génome nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme et importée dans les organelles (93-94). D'ailleurs, il est estimé qu'environ 4500 gènes nucléaires d'*Arabidopsis thaliana* sont d'origine cyanobactérienne et que seulement environ 1300 des protéines que ces gènes encodent sont destinées au chloroplaste (95). Présentement, il est prédit que le chloroplaste d'*Arabidopsis* contient entre 2500 et 3000 protéines et parmi elles, jusqu'à

la moitié serait d'origine cyanobactérienne (96). Les génomes chloroplastiques, toutes espèces confondues, contiennent en moyenne une centaine de gènes (156-158).

De plus, le génome des organelles est circulaire avec plusieurs embranchements (99, 128) et transcrit/traduit simultanément les gènes contenus sur l'ADN chloroplastique (130). La quantité de ribosomes chloroplastiques et la sensibilité de ceux-ci aux antibiotiques est similaire à ceux des bactéries (155). Toutes ces caractéristiques sont propres aux procaryotes. Ainsi, l'environnement dans lequel évoluent les génomes des organelles ressemble davantage à l'environnement des génomes procaryotes plutôt qu'à celui du génome nucléaire eucaryote. Nous étudions dans notre laboratoire les mécanismes par lesquels la plante assure la stabilité génomique des chloroplastes et des mitochondries dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Vu leur taille réduite, le génome des organelles n'encode aucune protéine impliquée dans la RRR servant à maintenir l'intégrité de ses génomes (99-100). Les organelles doivent plutôt importer leurs protéines s'occupant de ces réactions. Ces dernières années plusieurs études ont commencé à identifier des protéines impliquées dans le maintien de la stabilité génomique des organelles (6, 8-9, 14-15, 52, 62, 66, 102-104). Ces protéines s'apparentent plutôt aux protéines utilisées dans les voies de RRR chez les procaryotes ce qui est tout à fait logique étant donné l'origine endosymbiotique des organelles.

Le métabolisme de l'ADN; réplication, recombinaison et réparation.

Maintenir l'intégrité du génome est critique afin d'assurer la survie d'un organisme et ses fonctions cellulaires normales. Les dommages à l'ADN peuvent être de source endogène ou exogène, mais doivent être réparés. L'élimination ou la mutation de protéines impliquées dans le maintien de la stabilité génomique des organelles résulte souvent en des réarrangements génomiques majeurs dans le génome des organelles ce qui perturbe le fonctionnement normal des chloroplastes et/ou des mitochondries (10, 98). Les dommages à l'ADN des organelles de plantes peuvent d'ailleurs mener à différents effets (6, 52, 66), comme l'incapacité à produire un pollen fertile (107-109), la

stérilité totale (121-122) et la variégation (9, 10). La variégation se révèle être l'apparition de taches blanches sur les plantes, particulièrement sur les feuilles. Des dommages dans l'ADN des chloroplastes pourraient rendre ceux-ci incapables de synthétiser la chlorophylle donnant la couleur verte aux plantes

Les dommages à l'ADN peuvent interférer avec la réplication, requise pour la division cellulaire, la croissance et le développement des organismes. La vie d'une cellule est remplie d'événements qui peuvent potentiellement bloquer le réplisome d'une fourche de réplication et des lésions ou bases mutées dans l'ADN mènent invariablement à l'arrêt et/ou l'effondrement des fourches de réplication (123-124). De plus, une panoplie de protéines sont liées à l'ADN et peuvent empêcher ou retarder la progression d'une fourche répllicative (125). Néanmoins, il est essentiel de rétablir les fourches de réplication pour assurer la réplication complète de l'ADN (126-127). Il doit donc y avoir une forte coopération entre la réplication de l'ADN et les mécanismes de réparation permettant à la réplication de continuer. D'ailleurs, il est bien établi que des agents induisant des dommages à l'ADN sont plus nuisibles si administrés lors de l'étape de la réplication (124). Il a récemment été démontré chez *Arabidopsis thaliana* que deux ADN polymérases s'apparentant au type I procaryote, nommées POLIA et POLIB, sont localisées dans les organelles. Bien que ces deux polymérases soient impliquées dans la réplication de l'ADN, seule POLIB est aussi impliquée dans la réparation de l'ADN (66).

Plusieurs stratégies ont été développées afin de pallier aux dommages à l'ADN. Ces stratégies sont diverses et souvent conservées chez les organismes ayant un ancêtre commun rapproché (98). Deux constats émergent des récentes études de la réparation de l'ADN des organelles de plantes. Le premier est que la réparation de leur ADN dépend souvent de mécanismes de recombinaison entre des séquences d'ADN répété. Le deuxième constat est que les protéines impliquées dans les mécanismes de recombinaison incluent non seulement des familles de protéines d'origine procaryotes, mais aussi des familles de protéines qui sont exclusives aux organelles de plantes (10). Nous étudions ici deux familles de protéines qui répondent à ces thèmes. Les protéines RECA d'*Arabidopsis* des orthologues des RecA bactériennes impliqué dans la RH

(recombinaison homologue) (37, 75) et les protéines Whirly, une famille de protéines propre aux plantes impliquées dans le MMBIR (Micro Homology Break Induced Replication) (8-9).

Le BER, NER & MMR dans les organelles d'*Arabidopsis*

Les voies de réparation par excision de bases ou (Base Excision Repair BER), réparation par excision des nucléotides (ou Nucleotide Excision Repair NER) et de réparation de mésappariement (ou MisMatch Repair MMR) servent respectivement à réparer des bases mutées n'affectant pas la forme hélicoïdale de l'ADN, des bases mutées en des structures plus encombrantes qui perturbent la forme hélicoïdale de l'ADN et des bases incorrectement appariées. Ces voies de réparation de l'ADN sont largement inconnues dans le génome des organelles d'*Arabidopsis*, mais quelques protéines orthologues des protéines clés de ces voies chez d'autres modèles se retrouvent dans les organelles. Par exemple, en ce qui concerne le BER, une activité glycosylase-lyase/endonucléase impliquée dans la réparation de bases mutées a été détectée dans des extraits de chloroplastes d'*Arabidopsis* (103). Il a aussi été établi que la mitochondrie possède une activité DNA glycosylase spécifique au clivage de l'uracile (104).

Par contre pour l'instant aucun orthologue s'apparentant à un acteur traditionnel du NER ciblé aux organelles n'a été identifié. Il a toutefois été proposé que des mécanismes alternatifs existent dans les organelles (104). En ce qui concerne le MMR, il existe un orthologue de MutS ciblé à la mitochondrie d'*Arabidopsis*. MutS est impliqué dans la voie de MMR chez *E. coli*. L'orthologue d'*Arabidopsis* s'appelle MSH1, mais il semble plutôt contribuer à prévenir certains réarrangements dans l'ADN mitochondrial (14-15, 101). Autrement cette voie de réparation, comme toutes les autres dans les organelles, demeure largement inconnue.

La recombinaison homologue, la Ligation d'extrémités Non homologues et le MMBIR

La plupart des cellules possèdent deux voies principales pour réparer les bris double brin dans leur ADN (110). La première est la Ligation d'extrémités Non homologues (ou Non-Homologous End Joining NHEJ) qui fonctionne principalement en ligant ensemble les extrémités d'ADN double brin pour les réparer. La réparation de bris double brin par NHEJ permet à la réplication d'avoir lieu et évite l'apoptose chez les eucaryotes causés par l'accumulation de fourches de réplication arrêtées. Par contre, ce type de réparation peut conduire à une perte d'information génétique et des translocations de séquences d'ADN délétères (113). La réparation de bris d'ADN par un phénomène s'apparentant au NHEJ fut rapportée dans le chloroplaste d'*Arabidopsis*, mais cette voie semble avoir une contribution mineure comparativement aux autres voies disponibles (81).

Les cellules peuvent aussi réparer leur ADN par recombinaison homologue (RH). Cette voie utilise des séquences d'ADN homologues comme cible d'un échange de brin d'ADN afin de réparer des régions endommagées du génome. Ce type de réparation de bris double brin n'engendre aucune erreur dans la réparation de l'ADN et n'entraîne donc aucune perte d'information génétique (111). Plusieurs variations du mécanisme par lequel la RH opère existent. Ces mécanismes sont adaptés aux circonstances spécifiques où des dommages à l'ADN ont lieu et engendrent des conséquences différentes. Les mécanismes utilisés pour réparer les bris double brin sont présentés à la **Figure 1**. La **Figure 1A** présente la voie de «*Double Strand Break Repair*» (DSBR) qui se caractérise par la formation de deux jonctions de Holliday. La **Figure 1B** présente plutôt la voie de «*Synthesis Dependent Strand Annealing*» (SDSA) qui se caractérise entre autres par la formation d'une seule jonction de Holliday et une seule boucle D. La voie de SDSA de réparation diffère surtout de la DSBR car elle garantit un mode de réparation plus conservateur où seulement une des deux molécules d'ADN bicaténaire conserve sa séquence d'origine et la deuxième utilise le gabarit homologue de l'autre pour réparer sa lésion : on parle alors de conversion génique (115-116). La voie de DSBR peut engendrer ce mode dit plus conservateur mais aussi un second où les gabarits des 2

molécules d'ADN bicaténaire sont échangés : on parle alors de crossing over. Pour compréhension, les différents produits issus de ces voies de RH sont présentés à la **Figure 1C**. Ces voies de RH sont bien adaptées à réparer des bris double brin, mais pas à ceux générés par des lésions simple ou double à l'ADN double brin faisant face à une fourche répllicative. Ce type de lésions peut être réparé par le modèle de répllication recombinaison-dépendante (RDR). Au contraire des autres voies celui-ci requiert la réinitialisation de la fourche de répllication effondrée (117). Ces voies sont toutes adaptées à la réparation de bris double brin dans l'ADN et permettent une flexibilité à gérer les bris dans l'ADN tout en assurant une réparation libre d'erreurs.

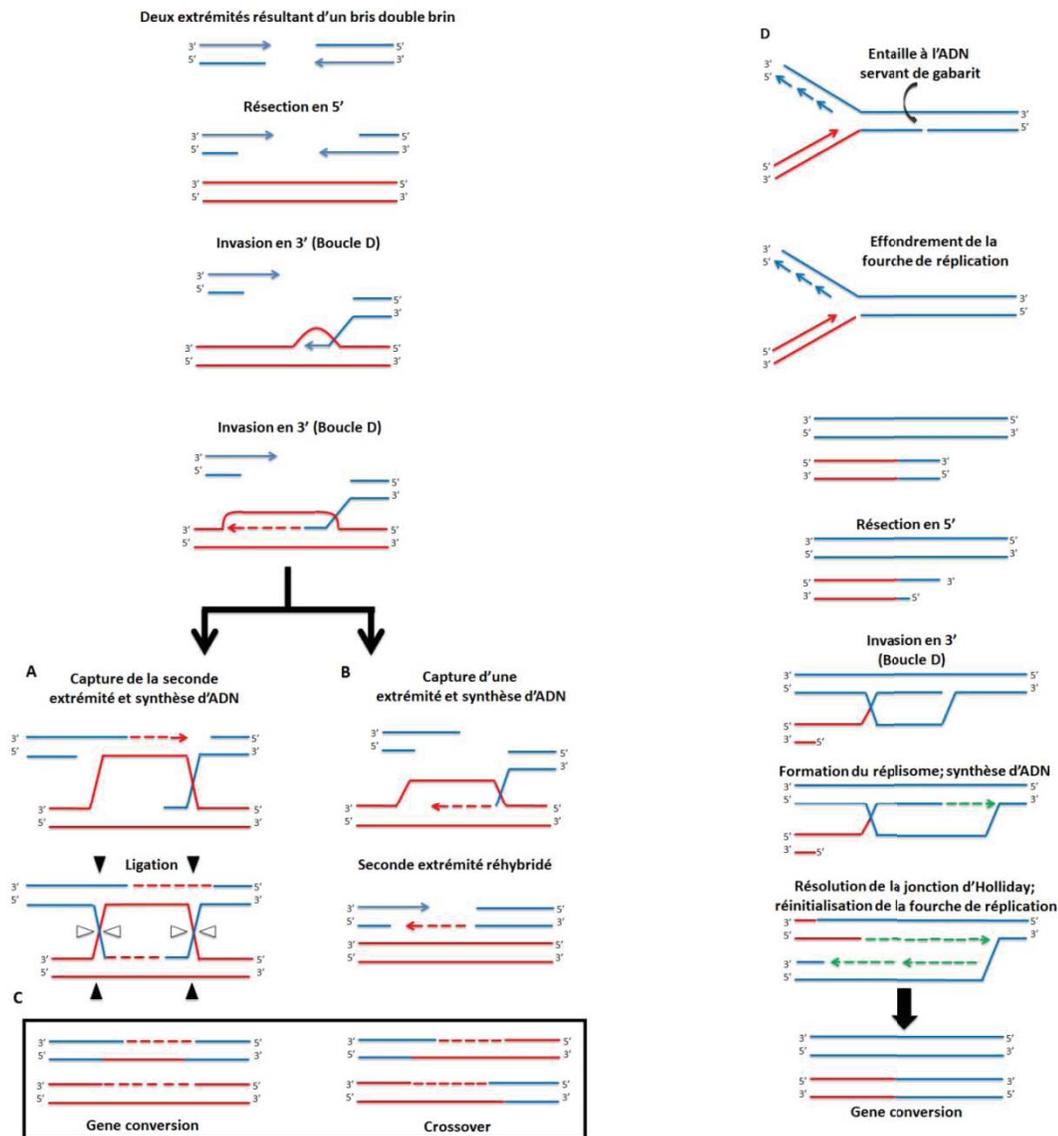


Fig. 1 Voies de la recombinaison homologue. **A.** La voie du «*Double Strand Break Repair*» (DSBR) qui se caractérise par la formation de deux jonctions de Holliday. **B.** La voie du «*Synthesis Dependent Strand Annealing*» (SDSA) qui se caractérise plutôt par la formation d'une seule jonction de Holliday et d'une seule boucle D. **C.** Produits de réparation du DSBR à gauche et du SDSA à droite. Les deux voies n'utilisent pas de la même façon le gabarit d'ADN utilisé pour réparer les lésions à l'ADN ainsi les produits de réparations diffèrent advenant que la séquence soit à 99% similaire à cause de la présence d'un polymorphisme singulier de nucléotide (ou Single Nucleotide Polymorphism SNP) par exemple. **D.** La voie du «*Replication Dependent Recombination*» (RDR) qui se caractérise par sa capacité à réinitialiser une fourche de réplication effondrée. Cette figure est tirée et modifiée de *Marechal & Brisson 2010* (10).

La réparation de bris double brins libres d'erreurs, mais aussi la réinitialisation des fourches de réplication requièrent une coordination très étroite entre deux complexes très sophistiqués : la machinerie enzymatique composant la RH et celle constituant l'appareil de réplication (112). Ces complexes doivent travailler ensemble très souvent, car la majorité des bris double brin sont engendrés par l'effondrement des fourches réplcatives. Spécialement lorsque celle-ci rencontre un bris simple brin ou double brin dans l'ADN (51). Les mécanismes par lesquels la RH fonctionne et par lesquels les fourches de réplication sont relancées génèrent plusieurs structures monocaténares dans l'ADN. Ainsi la résection de l'ADN par une exonucléase dans la voie de RH produit des extrémités monocaténares d'ADN, alors que la formation d'une boucle D génère une forme d'ADN simple brin transitoire. Ces formes d'ADN doivent être protégées car elles sont particulièrement recombino-géniques (10-11)

Les appareils de réplication et de RH doivent aussi travailler de concert avec des acteurs responsables de réparer les mutations aux bases de l'ADN lorsque la fourche réplcatrice rencontre ces dommages. Les mécanismes par lesquels ces réparations s'effectuent sont encore peu connus dans le cas des organelles de plante, mais on sait néanmoins qu'elles génèrent des formes intermédiaires d'ADN monocaténaire qui doivent être protégées (40, 112, 114). Les extrémités d'ADN monocaténaire résultant d'une résection en 5' comme indiqué dans les voies à la **Figure 1** sont, en temps normal, pris en charge par les protéines impliquées dans la recombinaison homologue. Par contre, si ces extrémités d'ADN monocaténaire sont laissées à elles même, elles peuvent effectuer une forme alternative de recombinaison homologue qui ressemble particulièrement à la voie de RDR. Une différence notoire de ce mécanisme est qu'il ne nécessite pas la présence des protéines impliquées dans la recherche d'homologie et l'échange de brin qui sont nécessaires à la RH (11). Les protéines responsables de la recherche d'homologie et l'échange de brin nécessaire à la RH sont Rad51 dans le noyau des eucaryotes et RecA chez les procaryotes. Une autre différence notoire dans ce mécanisme est que l'invasion est guidée par une homologie très courte, on parle d'une microhomologie (11). Pour référence, la RH chez *E. coli* nécessite au minimum 50 paires de bases (118), bien qu'une courte homologie de 2 à 3 nucléotides est connue comme étant suffisante pour

initier la synthèse d'ADN chez certaines polymérase (11, 137). Ce mécanisme alternatif s'appelle recombinaison dépendante de séquence de micro-homologie ou en anglais «*Microhomology Break Induced Replication*» (MMBIR). Le MMBIR se révèle étroitement similaire à la voie de la RDR de la RH présentée à la **Figure 1D**. Malgré l'absence des protéines Rad51/RecA, une fourche de réplication peut y être réinitialisée, mais avec une efficacité beaucoup moins grande comparativement à celles réinitialisées avec l'aide de Rad51/RecA (119-120). Le fait que ce mécanisme utilise une courte homologie de séquence pour entreprendre la réparation d'ADN implique qu'il sera statistiquement possible de retrouver cette microhomologie de séquence à plusieurs endroits sur le génome concerné dans le cas d'un organisme polyploïde. Ainsi ce mode de réparation n'est pas un mécanisme de réparation fidèle et conservateur (11).

Les Whirly dans la prévention du MMBIR

Les protéines Whirly forment une famille de protéines présente spécifiquement chez les plantes (131). Les différents membres de la famille des Whirly peuvent être retrouvés dans le noyau, le chloroplaste et la mitochondrie (8, 32, 35, 102, 131-132). Les Whirly lient l'ADN simple brin préférentiellement (34, 131, 133) et effectuent diverses fonctions liées au métabolisme de l'ADN comme la régulation de la transcription (34, 134-135), la modulation de la longueur des télomères (136) et le métabolisme des ARN chloroplastiques (35). Le génome nucléaire d'*Arabidopsis* encode trois protéines Whirly. Parmi ces dernières, WHY1 et WHY3 sont ciblées au chloroplaste tandis que WHY2 est ciblée à la mitochondrie (8, 32, 102). Notre laboratoire a récemment démontré que l'absence des protéines WHY1 et WHY3 dans le chloroplaste d'*Arabidopsis* occasionne une accumulation de molécules d'ADN réarrangées (8-9). Ce phénomène n'est d'ailleurs pas exclusif à *Arabidopsis* et a aussi été observé chez le maïs (8). Les molécules réarrangées qui accumulent dans le génome du chloroplaste d'*Arabidopsis* contiennent des délétions, des duplications et sont parfois circulaires. Ces modifications sont induites par recombinaison non-homologue de séquences présentant des microhomologies (8). Ces réarrangements proviennent d'un mécanisme de

réparation non conservateur et les protéines WHY1 et WHY3 empêchent ce mécanisme d'opérer (8).

Ces types de réarrangements sont caractéristiques du MMBIR et sont aussi connus pour augmenter en réponse à un stress génotoxique provoquant des cassures double brin dans l'ADN (11). La ciprofloxacine est un agent génotoxique inhibant les gyrases situées exclusivement dans les chloroplastes et la mitochondrie (12). L'inhibition par la ciprofloxacine s'effectue spécifiquement après que les gyrases aient clivé l'ADN bicaténaire (Figure 2). Comme de fait, les plantes ne possédant pas de Whirly accumulent significativement plus de réarrangements de type MMBIR dans le génome des organelles des plantes soumises à la ciprofloxacine (9). Ceci suggère que les Whirly font partie des protéines impliquées dans le maintien de la stabilité génomique des organelles. Pour compréhension, la **Figure 2A** présente le mode d'action par lequel la ciprofloxacine inhibe les gyrases et la **Figure 2B** présente un schéma de ces réarrangements.

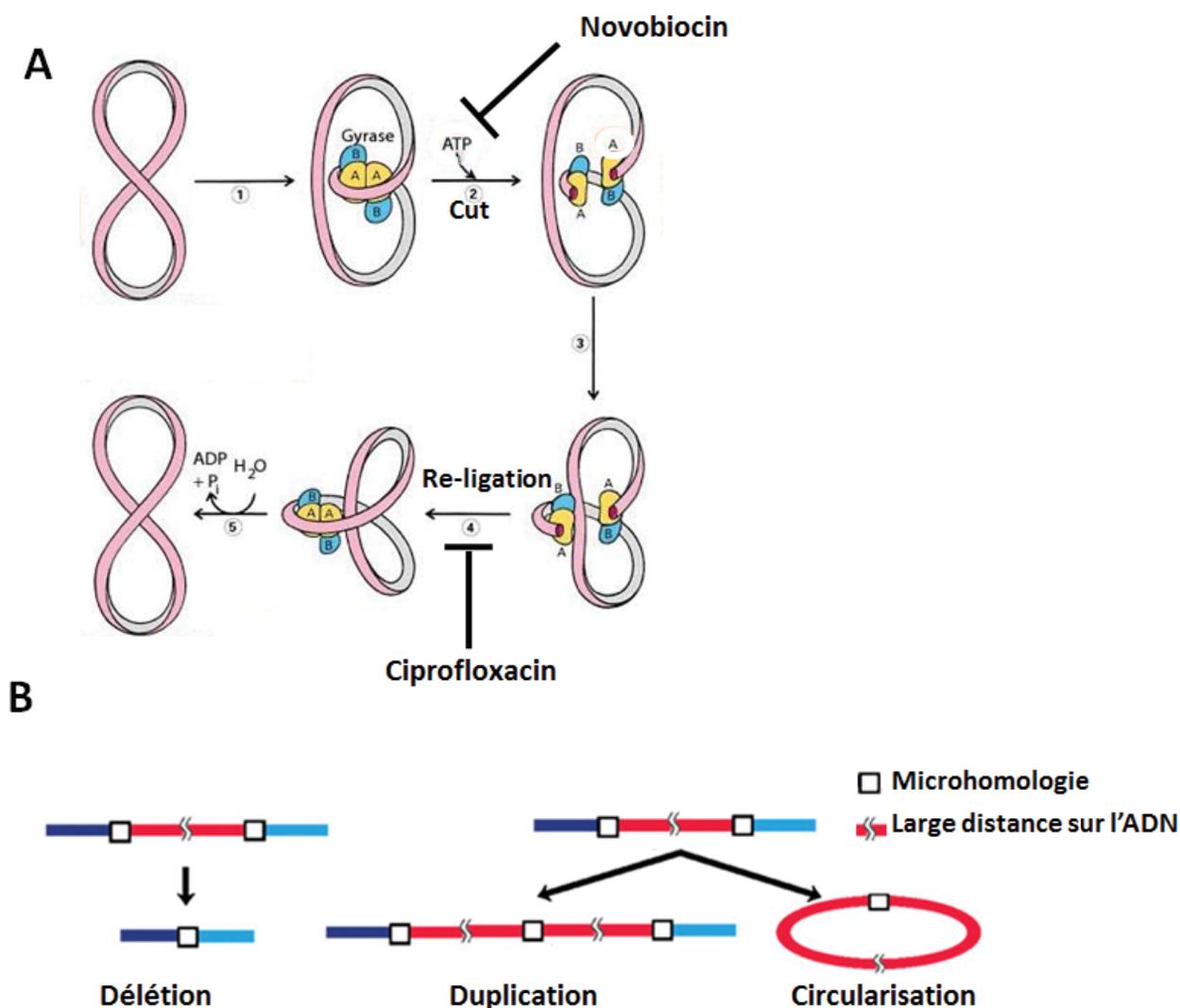


Fig. 2 Mode d'action de la ciprofloxacine sur les gyrases et réarrangements de type MMBIR. **A.** La ciprofloxacine inhibe les gyrases spécifiquement après que celles-ci aient effectué une coupure double brin dans l'ADN. Les gyrases effectuent cette coupure pour relaxer la tension sur l'ADN super enroulé en aval des fourches répliquatives (154). Une fois la gyrase inhibée par la ciprofloxacine elle est incapable de religuer l'ADN clivé. **B.** Réarrangements génomiques induits par de courtes séquences d'ADN homologue (microhomologies) (carré blanc), et séparées par une large distance sur l'ADN. Ces réarrangements illégitimes provoquent des délétions, des duplications et/ou des circularisations de l'ADN. La Figure 2b est tirée et modifiée de *Cappadocia et al. 2009* (9).

Les protéines RECA d'*Arabidopsis* dans le maintien de la stabilité du génome des organelles

Comme pour les autres voies de réparation de l'ADN dans les organelles de plante, les mécanismes par lesquels la RH s'effectue sont encore mal compris. Quelques acteurs des voies de RH des organelles ont tout de même été identifiés chez *Arabidopsis*. Dans la mitochondrie, *MSH1*, un homologue de la protéine MutS d'*E. coli*, (101) et *OSB1* (62) influencent la RH de l'ADN mitochondriale. Les protéines OSB tout comme les protéines Whirly lient l'ADN simple brin et font partie d'une famille spécifique aux plantes (62). L'effet principal de l'inactivation du gène *OSB1* est l'accumulation de produits provenant d'une recombinaison entre de larges séquences répétées et des séquences répétées de taille intermédiaire. Dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis* il existe deux larges séquences répétées de 6,5 et 4,2 kb ainsi qu'une trentaine de séquences intermédiaires d'une longueur de 100 paires de bases ou plus (138-139).

De plus, trois orthologues de la protéine bactérienne RecA, une protéine clé dans la recombinaison homologue chez les bactéries (37-39, 43, 72-75), sont encodés par le génome nucléaire d'*Arabidopsis*, RECA1, RECA2 et RECA3 (15, 33, 141). La protéine RECA1 est ciblée exclusivement au chloroplaste, RECA3 est ciblée à la mitochondrie et RECA2 est ciblée à ces deux organelles (15). RecA, ou recombinaise A, occupe un rôle crucial chez la bactérie dans la recombinaison homologue. Comme l'indique la **Figure 1**, suivant un bris double brin dans l'ADN il y a résection en 5' des extrémités d'ADN (37, 142). Ces extrémités sont alors immédiatement couvertes par les protéines SSB (69, 72) qui, avec l'aide de RecBCD (74-75) ou RecF (143-145), entraînent le recrutement sur l'ADN simple brin de multiples protéines RecA. Les protéines RecA organisées en filament le long de l'ADN permettent alors la recherche d'homologie avec une large molécule d'ADN homologue (38, 146-151). Une fois cette recherche terminée, RecA catalyse l'invasion de l'extrémité 5' dans un duplex d'ADN homologue ce qui engendre la formation d'une boucle D (38, 146-151). La protéine RecA de *E. coli* est aussi impliquée dans un mécanisme particulier lorsqu'une fourche de réplication rencontre

une mutation dans l'ADN. Alors que le réplisome s'y arrête, une hélicase continue à dérouler l'ADN bicaténaire au-delà de la mutation jusqu'à 1000 paires de bases plus loin, générant ainsi de larges boucles d'ADN monocaténaire. RecA se lie à l'ADN monocaténaire sur le brin direct et entraîne avec RecFOR le départ du réplisome et la formation d'une fourche de réplication inversée. Une fois la mutation réparée par BER, NER ou MMR la fourche inversée est coupée et les fragments d'ADN bicaténaire redirigée vers la voie de la RH (40). La **Figure 3B** présente ce mécanisme. Il a d'ailleurs été démontré que le brin direct d'une fourche de réplication, advenant qu'elle rencontre une mutation dans l'ADN, peut former une boucle D directement sur le brin d'ADN indirect pour s'en servir comme gabarit et continuer au-delà de la mutation sans la réparer (112). Ce mécanisme est possible grâce à une polymérase imprécise et non stringente (12, 144). Pour compréhension, la **Figure 3A** présente ce mécanisme. Dans cette circonstance unique, on ne sait pas si RecA entraîne l'invasion de l'ADN monocaténaire sur le brin indirect, mais ce comportement, recherche d'homologie et invasion d'ADN en 5' sur un duplex homologue, est typique des RecA. Ces deux mécanismes ont été récemment découverts chez *E. coli*. Les deux cas proposés à la **Figure 3** possèdent des aspects mécanistiques propres à la recombinaison homologue telle qu'on la connaît et des circonstances où une activité RecA seraient essentielles pour permettre le comportement de ces mécanismes. D'ailleurs, on sait que RecA est nécessaire pour la voie de la **Figure 3b**. De plus, cette voie de réparation associe RecA avec des voies de réparation différentes telles les BER, NER et MMR travaillant en coopération avec à la RH pour assister les mécanismes de réparation.

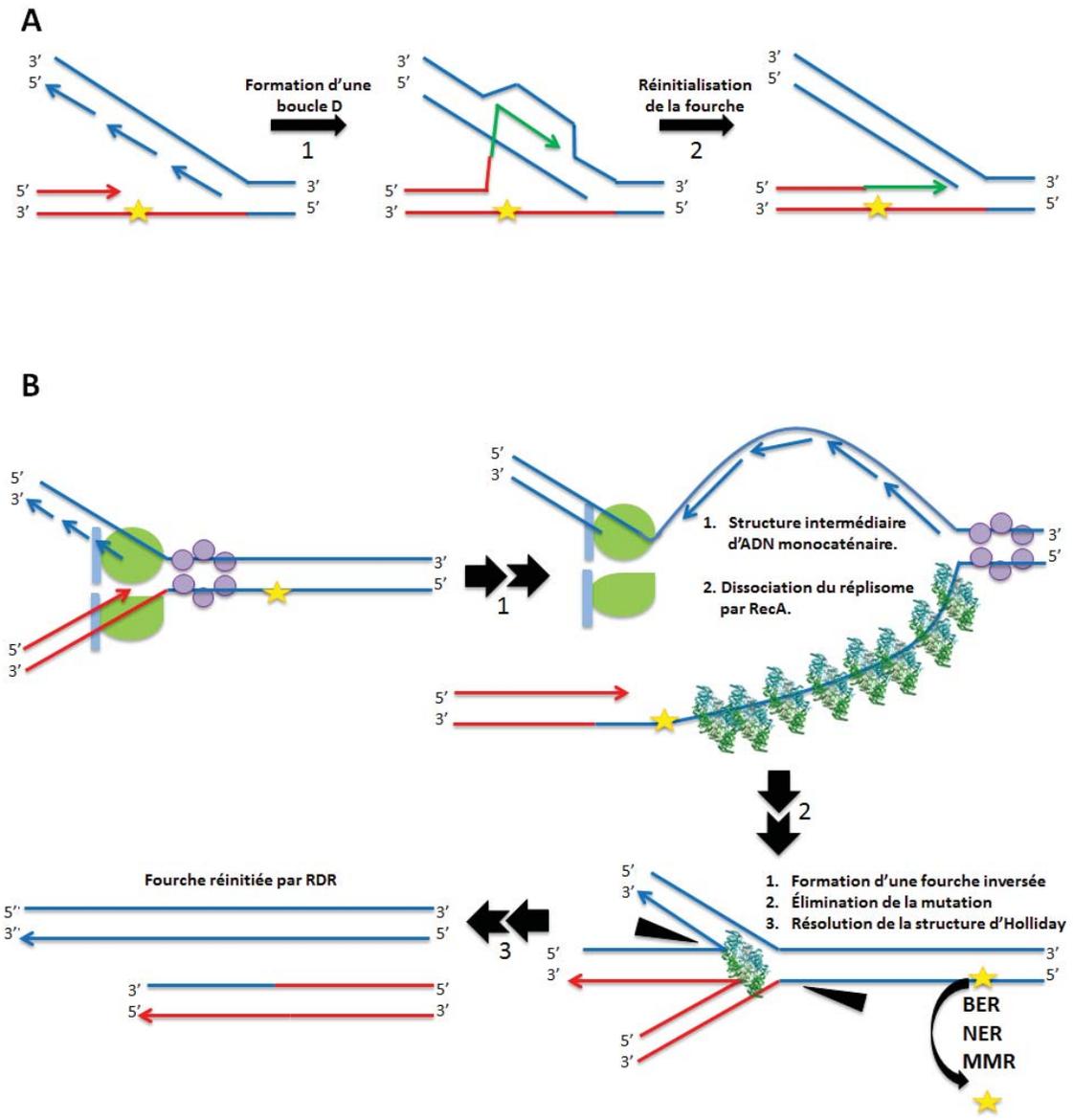


Fig. 3 Mécanismes alternatifs de réplication et de réparation de l'ADN empruntant certaines caractéristiques à la RH. A. Contournement d'une mutation (étoile jaune) à l'ADN par le réplisome via une recombinaison homologue par le brin réplcatif direct (flèche rouge puis verte) sur le brin indirect (en bleu). La **Figure 3a** est tirée de *Maher et al. 2011* (112). **B.** Réinitialisation d'une fourche de réplication suivant la rencontre d'une base mutée (étoile jaune) dans l'ADN. Le réplisome (en vert) rencontre une base mutée et s'y arrête. La hélicase (en mauve) qui déroule l'ADN continue malgré tout à dérouler l'ADN sans le réplisome jusqu'à 1000 paires de bases plus loin. Ceci génère deux fragments d'ADN monocaténaire. Le brin indirect (bleu avec flèches bleues) est resynthétisé en ADN double brin. Le brin direct est chargé

de protéines RecA qui catalyseront la formation d'une fourche inversé (au bas à droite). La base mutée est réparée. La fourche est résolue et les fragments d'ADN générés sont redirigés vers la voie de RDR. La **Figure 3B** est inspirée de *McInerney et al. 2007* (40).

En ce qui a trait aux protéines homologues de RecA chez *Arabidopsis*, il a été rapporté que l'absence de RECA3 ou de RECA2 dans la mitochondrie engendre une accumulation de produits provenant d'une recombinaison entre des séquences de taille intermédiaire (6, 15, 140). Il a aussi été démontré que RECA1 (63-64), RECA2 (6) et RECA3 (6, 141) peuvent compléter une lignée mutante RecA- stressée chez *E. coli* (6). Du côté du chloroplaste, il a été établi que l'absence de RECA1 engendre une diminution marquée d'ADN chloroplastique comparativement à la plante sauvage. Ces niveaux diminués sont comparables à une plante normale traitée à la ciprofloxacine suggérant que l'absence de RECA1 compromet l'habileté de prendre en charge les bris double brin occasionnés normalement dans le génome (52). De plus, la localisation de l'expression la plus importante de RECA2 et RECA3 chez *Arabidopsis* se situe spécifiquement au niveau des tissus hautement répliatifs et sexuels (6). Pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les protéines RECA d'*Arabidopsis* participent à un mécanisme de réparation de l'ADN, mais suggèrent qu'elles sont aussi étroitement liées à la répliation de l'ADN.

Hypothèse de ce travail

Étant donné l'importance centrale des organelles dans la production d'énergie des végétaux et le peu d'information disponible concernant le métabolisme de leur ADN, il devient impératif de consacrer nos efforts à l'étude de ces phénomènes. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de tester la contribution des gènes *RECA* de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* au maintien de la stabilité des génomes des organelles. Nous énonçons l'hypothèse que les RECA de plantes se comporteront effectivement comme leurs orthologues bactériens en catalysant l'échange de brins homologues lors de la réaction de RH. Nous proposons donc d'utiliser la méthode de la génétique inverse pour prouver leur implication dans les voies de réparation de l'ADN des organelles. Nous

prévoyons donc que les mutants des gènes RECA auront des génomes instables et sensibles aux stress génotoxiques. Ceci pourra être testé grâce à diverses méthodes qui nous permettent de détecter la présence de réparation non conservatrice de l'ADN.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Plantes et conditions de cultures

Les lignées mutantes *recA1-1* (SALK_057982), *recA1-2* (SALK_072979), *recA2-1* (SALK_076237), *recA2-3* (SALK_118143), *recA3-1* (SAIL_1278_F04), *recA3-2* (SALK_146388), et *why1* (SALK_099937) d'*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; écotype *Columbia-0*) ont été obtenues de l'Arabidopsis Biological Resource Center. La position exacte de l'insertion des mutants *recA1-1*, *recA1-2*, *recA3-1*, *recA3-2*, et *why1* a été établie comme étant respectivement au 1^{er} intron, 11^{ème} exon, en 3'UTR, 5^{ème} exon et en 5'UTR.

La lignée mutante *why3* a été obtenue du Seattle TILLING Project (5). Une des lignées isolées et identifiées il68D8 eut son codon 138 changé de TGG à TGA, un codon stop. Les lignées hétérozygotes ont été rétrocroisées sur huit générations consécutives avec la plante sauvage *Col-0* afin d'éliminer les autres mutations ponctuelles de il68D8. Finalement, la lignée homozygote mutante du dernier rétrocroisement a été nommée *why3*, la mutation au gène *AtWHY3* étant la seule retenue. Les mutants *why3* ainsi obtenus ont été ensuite croisés avec le mutant d'insertion *why1* pour produire le double mutant *why1why3* (8). Le triple mutant *recA1-1* x *why1why3* a été obtenu en croisant le double mutant *why1why3* avec le mutant *recA1-1*.

Avant de semer les graines, ces dernières ont été stérilisées sous hotte. La stérilisation s'est faite d'abord en hydratant les graines dans 10 mL d'eau distillée stérile pendant 1 heure sur rotateur. Ensuite, l'eau a été retirée et remplacée par 10 mL d'une solution d'alcool 90% (Commercial Alcohols) pour 5 minutes sur rotateur. Suivant quoi, la solution d'alcool a été retirée et substitué par 10 mL d'une solution d'eau de javel 5% pour 5 minutes sur rotateur. Les graines ont ensuite été rincées trois fois pour 5 minutes avec 10 mL d'eau distillée stérile.

Après stérilisation des graines, celle-ci ont été soit semées sur terre ou semées dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture de type Murashige & Skoog (MS) (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 1 % de sucrose (BioShop) et 0,8 % d'agar (PlantMedia) avec

ou sans ciprofloxacine (Sigma-Aldrich). Après 3 jours de vernalisation dans le noir à 4 °C, les graines ensemencées ont été placées sous lumière (100 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 heures de lumière/8 heures de noirceur) à une température moyenne de 22 °C. Les plantes poussant sur le milieu de culture MS ont été récoltées 3 semaines après la vernalisation. Les plantes ont été récoltées en tirant doucement sur celles-ci pour en avoir la totalité (incluant les racines) puis en les congelant instantanément dans l'azote liquide. Les plantes ayant poussé sur milieu de culture Murashige & Skoog ont été combinées pour créer des échantillons de 100 mg pour extraction d'ADN au CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) et extraction d'ARN au trizol (Invitrogen). Une feuille (jusqu'à ~20 mg) a été prélevée pour en extraire l'ADN par la méthode d'Edwards dans le cas des expériences de génotypage.

Génotypage des lignées mutantes

Les mutants d'insertion ont été génotypés en utilisant des paires d'amorces spécifiques aux allèles sauvages et mutantes. Les paires d'amorces utilisées pour le génotypage sont décrites au **Tableau 1**. La mutation ponctuelle *why3* a été détectée en digérant avec l'enzyme de restriction MvaI (Fermentas) le produit PCR des amorces W138 décrites au **Tableau 1**. Les amorces W138 chevauchent la mutation ponctuelle le produit de PCR peut être digéré alors que l'allèle sauvage ne peut l'être (8). Les réactions PCR ont été effectuées dans un appareil Biometra Tgradient. Les polymérases utilisées ont été celles de Genescript et la PCR a été menée en suivant les directions du manufacturier. Les réactions PCR ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose (Bioshop).

Tableau 1. Paires d'amorces utilisées en qRT-PCR et géotypage.

Amorces pour qRT-PCR		
<i>RECA1</i>	Ti1RecA1REV	CGC TGG ATC AAA GGC ATG CTC T
	Ti1RecA1FOR	GGT GGA GGC CTA CCA AAG GG
<i>RECA2</i>	Ti5RecA2REV	CAA CTC CCA AAG CTA CAT CAA GGG C
	Ti5RecA2FOR	TGG TTG GAA CAT CGT TTC AGC TCC
<i>RECA3</i>	Ti2RecA3REV	GAG AAG GAT CCA TGG CAT TCT CTG C
	Ti2RecA3FOR	GGA GTT GGA GGA TTG CCA AAG GG
<i>β-Tubuline</i>	3#Tubu-qRT	GGG AAC CTC AGA CAG CAA GTC AC
	5#Tubu-qRT	CCT TCT CGG TGT TCC CTT CAC C
Amorces pour géotypage		
<i>recA1-1</i>	3-SALK057982	ACC AGC ACT CCC CAA TCT TGT
	5-SALK057982	TCC TCG ACC GCG TAA GTT CTT
<i>recA1-2</i>	3-SALK072979KO	GAG CCT GAA AAC AGA GAC CCA
	5-SALK072979KO	AGA GGT GAC TAG CGG AGG AAT
<i>recA2-0</i>	5-RecA2KO	TAG GGG CGT GTT GTG GAG ATA
	ComplementRecA2	GAC TTC CCG TTG TCT GCA CAA
<i>recA2-3</i>	5-RecA2KO	TAG GGG CGT GTT GTG GAG ATA
	ComplementRecA2	GAC TTC CCG TTG TCT GCA CAA
<i>recA3-1</i>	3RecA3KOSAIL	CTT CTG TCC CTT CCA CGT TGT
	5RecA3KOSAIL	AGT GGT CTC AAT GTC TGC GTC
<i>recA3-2</i>	3-3g10140KO	CAC ATT GAG GGG CAA GAG CA
	5-3g10140KO	CGG GTT CCC TCA ACC TTG AT
<i>why1</i>	3-AtWhy1KO	TGA CCC ACG TAA AAT CTA GCA GGC
	5-AtWhy1KO	GGC CAA TCG TTG GTC CTA AAA TCG
<i>why3</i>	W138rev	GCC CAA GGC TAA CTA GAT TAC CGA T
	W138for	CAG CTG GTG TTC GTC AAT ATG CCT
SALK insertion Left Border	LBb1.3	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C
SAIL insertion Left Border	5' SAIL TDNA	CTT CCA CAC GTG GAT CCA TGA

Détermination de la position des insertions

Pour chaque lignée mutante, les produits des réactions PCR effectuées avec les paires d'amorces spécifiques aux allèles mutantes ont été découpés des gels d'agarose puis purifiés en utilisant la trousse DNA Gel Extraction Kit de QUIAGEN. En utilisant une amorce disposé sur le génome à proximité de l'insertion des lignées mutantes prédite par «*The Arabidopsis Information Resource*» (TAIR) les produits ont été séquencés à la plateforme génomique de l'IRIC.

Isolation d'acides nucléiques

Pour le génotypage, l'isolement de l'ADN s'est faite par la méthode d'Edwards. Une feuille a été coupée pour chaque plante à génotyper. Celle-ci a été ensuite broyée à l'aide d'un pilon dans un tube Eppendorf. Ensuite, 400 uL de la solution tampon d'extraction (1) ont été ajoutés à chaque échantillon. Suite à quoi, les échantillons ont été broyés de nouveau à l'aide d'un pilon. Les échantillons ont été, par la suite, incubés une heure à température pièce. Après incubation, chaque échantillon a été centrifugé à 13.4 g pendant 3 minutes. Ensuite, 300 uL du surnageant a été ajouté à 300 uL d'isopropanol (Anachemia), suivi d'une incubation de 2 minutes à température pièce et d'une centrifugation à 13.4 g pendant 5 minutes. Finalement, les culots ont été séchés à l'air libre pendant environ 1 heure et dissous dans 50 uL d'eau milliQ.

Tampon d'extraction Edwards

200 mM Tris-HCl pH 7.5 (Bioshop & Bioshop)

250 mM NaCl (Bioshop)

25 mM EDTA (Bioshop)

0.5% SDS (Bioshop)

Pour tout ADN servant à des expériences plus sensibles, notamment la détection des réarrangements génomiques illégitimes dans le chloroplaste, la technique d'isolation d'ADN au CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) a été utilisée. Ici, chaque échantillon de 100 mg a été broyé avec un pilon dans un tube Eppendorf contenant de l'azote liquide. Ensuite, 400 uL de tampon CTAB (2) préchauffé à 65 °C a été ajouté à

chaque échantillon après quoi ces derniers ont été incubés 30 minutes à 65 °C. Suivant l'incubation, 200 uL de phénol (Bioshop) et 200 uL d'un mélange 96 % chloroforme (Bioshop) – 4 % alcool isoamyl (Anachemia) a été ajouté aux échantillons et ceux-ci, immédiatement après, ont été vortexés 5 secondes. Par après, les échantillons ont été centrifugés à 13.4 g pendant 2 minutes et 375 uL du surnageant résultant ont été transféré à un autre microtube contenant 375 uL d'un mélange de 96 % chloroforme – 4 % alcool isoamyl. Une deuxième fois, les échantillons ont été vortexés à 13.4 g pendant 2 minutes et 350 uL du surnageant résultant transférés à un nouveau tube contenant 350 uL d'isopropanol (Anachemia). Les échantillons ont été incubés 10 minutes à 25 °C, centrifugés à 13.4 g pendant 10 minutes, le surnageant a été remplacé par 750 uL d'éthanol 75% froid (Commercial Alcohols). Les échantillons ont été incubés 2 minutes à 25 °C puis centrifugés à 13.4 g pendant 3 minutes. L'éthanol a été retiré puis, les culots séchés à 42 °C pendant 15 minutes. Les culots ont été finalement resuspendus dans un mélange de 50 uL d'eau milliQ et de 0.5 uL de RNase A (Fermentas).

Tampon d'extraction CTAB

2% CTAB (Sigma-Aldrich)

100 mM Tris-HCl pH 8 (Bioshop & Bioshop)

20 mM EDTA (Bioshop)

1.4 M NaCl (Bioshop)

0.2 % β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

0.1 mg/ml proteinase K (Fermentas)

Pour les expériences de qRT-PCR la technique d'isolation d'ARN au Trizol a été utilisée. Pour débiter, chaque échantillon de 100 mg a été broyé avec un pilon dans un microtube contenant de l'azote liquide et aussitôt remis dans un seau d'azote liquide. Une fois tous les échantillons broyés, 1mL de Trizol (Invitrogen) a été ajouté à chaque échantillon puis vortexé 30 secondes et remis de nouveau dans un sceau d'azote liquide. Les échantillons ont été ensuite sortis de l'azote liquide et décongelés avec leur capuchon ouvert près d'une flamme 20 minutes à 25 °C. On ajoute ensuite 200 uL de chloroforme (Bioshop) puis les échantillons sont vortexés 30 secondes puis incubés à 25

°C pendant 10 minutes. Après centrifugations à 13 g pendant 20 minutes, 450 uL de surnageant est transféré dans un tube contenant 450 uL d'isopropanol (Anachemia). Les échantillons sont centrifugés à 13 g pendant 10 minutes, puis les culots lavés avec une solution d'éthanol 75% RNase free (Commercial Alcohols) et centrifugés de nouveau à 13 g pendant 10 minutes. L'éthanol est enlevé, les culots séchés puis, resuspendus dans 30 uL d'eau diéthyle pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich).

Pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc), la trousse de RT-PCR de Fermentas a été utilisée en suivant les directions du manufacturier.

qPCR

L'ARN a été isolé par la technique du Trizol à partir d'échantillons de 100 mg et ensuite, l'ADNc, à l'aide de la trousse RT-PCR de Fermentas. La PCR en temps réel a été effectuée en utilisant la solution SYBR green I master mix (SABiosciences) selon les directions du manufacturier. Toutes les réactions qPCR a été préparées en ajoutant les réactifs dans cet ordre : 2,5 ul d'ADNc dilué, 10 uL d'une solution contenant les deux paires d'amorces à une concentration de 1µM et finalement 12,5 uL du master mix SYBR green. Les paires d'amorces utilisées sont décrites au **Tableau 2**. L'efficacité de l'amplification de chaque réaction a été déterminée en diluant les échantillons d'ADNc. La calibration nous permis de déterminer qu'une dilution optimale de l'ADN complémentaire était de 1/10 dans l'eau milliQ. Dans chacun des cas, nos courbes de fusion nous confirmèrent la présence d'un seul produit. L'amplification des produits a été effectuée en utilisant le LightCycler480 (Roche) et toutes les données ont été analysées en utilisant le programme Light-Cycler480 software version 1.5. Chaque expérience a été effectuée en triplicata biologique et en quadriplicata technique.

Tableau 2. Paires d'amorces utilisées pour les expériences PCR de MMBIR.

Paire d'amorce (PA)	Nom de l'oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide
Amorces pour détecter recombinaisons illégitimes		
PA1	31138REV	AAT AGC CTA GCG CAT CGA ACG
	20481FOR	GCG TTG ATC TAA TTG CCA CCG
PA2	40130REV	GGG AAG AGG AGG AAC ATG TCA
	50251FOR	GGC CCC TTC CTA ATT GGA GAT
PA3	84761REV	CCT TAG GCA CGG CCA TAC ATA
	95260FOR	AAC CTG CTA GTG GAG GAA GAC
PA4	105961REV	GCG TTA CTC AAG CCG ACA TTC
	116007FOR	AAA CCA CTC ATG CCC GGC AAT
PA5	69633REV	GAG GAA CAT GTA CTC GGG TGT
	59291FOR	AGG CCT AGT CTT TCC GGG AAT
PA6	111330REV	TCA ACA GCG GGA TTA ACC GCA
	121141FOR	AAC GTC ATC CGG TTA CCG GTT
PA7	50461REV	GAG ACG TCT ACC ACA ACA ACC
	59311FOR	AGG CCT AGT CTT TCC GGC AAT
PA8	68821REV	ACG CGG ATA TAT AGC TCG GAG
	79920FOR	CCA TGC CGT TCG GAA GTG ATT
PA9	10501REV	TGA CTG CCT TAC CAA TCG TCG
	30511FOR	GCT GCC TCC TTG AAA GAG AGA
PA10	60182REV	ATA TAA AGG ACA CGC CGG GCA
	50251FOR	GGC CCC TTC CTA ATT GGA GAT
PA12	69633REV	GAG GAA CAT GTA CTC GGG TGT
	79920FOR	CCA TGC CGT TCG GAA GTG ATT
PA13	50461REV	GAG ACG TCT ACC ACA ACA ACC
	68821FOR	CTC CGA GCT ATA TAT CCG CGT
PA14	121141REV	AAC CGG TAA CCG GAT GAC GTT
	131149FOR	CAA ACG AGG AAA GGC TTA CGG TG
PA15	152831REV	ATT GCG TGT GCT CGG GGT AG
	10501FOR	CGA CGA TTG GTA AGG CAG TCA
PA16	95260REV	GTC TTC CTC CAC TAG CAG GTT
	105961FOR	GAA TGT CGG CTT GAG TAA CGC
PA17	31138REV	AAT AGC CTA GCG CAT CGA ACG
	40130FOR	TGA CAT GTT CCT CCT CTT CCC
PA18	79920REV	AAT CAC TTC CGA ACG GCA TGG
	89344FOR	ATC GAA ATT CTT GAT CAA TGG AGG AAC AAT
YCF2	YCF2REV	TGT TTC GCC TCT TAC TCG GAG
	YCF2FOR	GAT CTC TGA GAG CTG TTT CCG

Détection des réarrangements génomiques illégitimes du chloroplaste

L'ADN a été isolé par CTAB à partir d'échantillons de 100 mg. Les PCR ont été effectuées en utilisant la Taq DNA polymérase (Felden) et la PCR a été menée en suivant les directions du manufacturier. Les réarrangements génomiques ont été détectés en utilisant des paires d'amorces espacées d'en moyenne 10 kb placées dos à dos ou bien face à face comme indiqué à la **Fig. 4**. Au total, 17 paires d'amorces couvrant la majorité du génome du chloroplaste ont été utilisées, elles sont détaillées au **Tableau 2**. Les paires d'amorces #1 à 13 ont été utilisées auparavant aux mêmes fins dans l'article de *Cappadocia et al. 2009* (9). La paire d'amorces #11 n'a pas été utilisée, car elle se situait essentiellement à la même position que la paire d'amorces #1. Les paires d'amorces #14 à 18 ont été ajoutées, car elles couvrent des régions du chloroplaste n'ayant pas été examinées antérieurement. La position des amorces relativement au génome du chloroplaste est présentée à la **Figure Supplémentaire 1**. Les PCR ont été effectuées sur la plante sauvage Col-0 et les mutants *recA1-1*, *recA1-2*, *why1why3* et *recA1-1 x why1why3*. Les réactions PCR ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose (Bioshop). La quantité d'ADN dans chaque puit a été équilibrée avec de courtes amplifications PCR du gène chloroplastique *YCF2*.

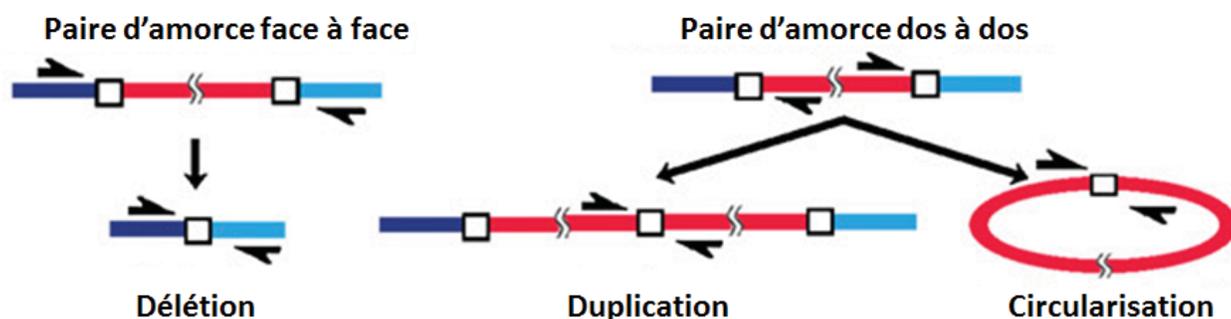


Fig. 4 Schéma de la stratégie PCR utilisée pour détecter des réarrangements de type MMBIR. Les amorces disposées face à face à gauche détecteront des réarrangements génomiques résultant d'une délétion. Les amorces disposées dos à dos détecteront des réarrangements génomiques résultants d'une duplication ou d'une circularisation.

RÉSULTATS

Isolement des mutants du gène *RECA3*

Pour examiner la fonction des recombinaases A (*RECA*) d'*Arabidopsis thaliana* ciblées aux organelles, nous avons employé une approche de génétique inverse. La première étape a été d'obtenir des plantes mutantes disponibles à la communauté scientifique et de les caractériser. Pour ce faire, nous avons en premier lieu étudié les mutants du gène *RECA3*. Une lignée de l'institut SALK a été obtenue, la lignée mutante *recA3-2* (3). Une autre lignée a été obtenue de la librairie de mutants d'insertion de la compagnie Syngenta, communément appelée SAIL (Syngenta Arabidopsis Insertion Library), la lignée mutante *recA3-1* (4). À ce jour peu de travaux ont été effectués avec ces lignées *RECA3*. La majorité des informations connues sur ces lignées/sur *RECA3* au moment où le mémoire fut écrit sont mentionnées à l'introduction page 13 et 16. Aucune de nos lignées ne fut caractérisée préalablement en ce qui a trait à l'expression et la position des insertions. Les plantes obtenues étant hétérozygotes nous avons semé les graines sur terre et laissé les plantes s'autofertiliser. La progéniture de quelques-unes de ces plantes mutantes a été recueillie et semée de nouveau sur terre afin d'isoler les mutants homozygotes *recA3-2* et *recA3-1*. Le génotypage des plantes par PCR a permis d'isoler les mutants homozygotes pour les 2 lignées (**Fig. 5B**). À partir des produits PCR générés avec les amorces servant à détecter l'allèle mutant, la position exacte des insertions a été déterminée une fois ces produits purifiés du gel et séquencés. La position exacte à partir du codon initial ATG est de 1142 nucléotides à l'intérieur du 5^e exon pour *recA3-2* et de 2095 nucléotides en aval du codon stop en 3'UTR pour *recA3-1* (**Fig. 5A**). Sur terre, le mutant *recA3-1* ne présente aucun phénotype le différenciant de la plante sauvage. Par contre, le mutant *recA3-2* présente un retard de croissance (**Fig. 5C**). Ce retard de croissance se poursuit jusqu'à l'étape de floraison. L'âge adulte *recA3-2* présente d'autres phénotypes tels que des feuilles et des tiges rabougries ou chétives.

Pour déterminer les conséquences des insertions dans les mutants *recA3-1* et *recA3-2* sur l'expression du gène *RECA3* nous avons effectué des expériences qRT-PCR (**Fig. 5D**). Les résultats de cette expérience attestent que l'expression de *RECA3* dans le mutant *recA3-1* est réduite de moitié comparativement au gène de la plante sauvage.

L'expression de *RECA3* dans le mutant *recA3-2* demeure quant à elle au même niveau que celui de la plante sauvage. N'ayant qu'un seul mutant «*Knock-Down*» (KD) et aucun mutant «*Knock-Out*» (KO) pour le gène de *RECA3* nous avons donc concentré nos efforts sur les deux autres gènes de la famille, *RECA1* et *RECA2*.

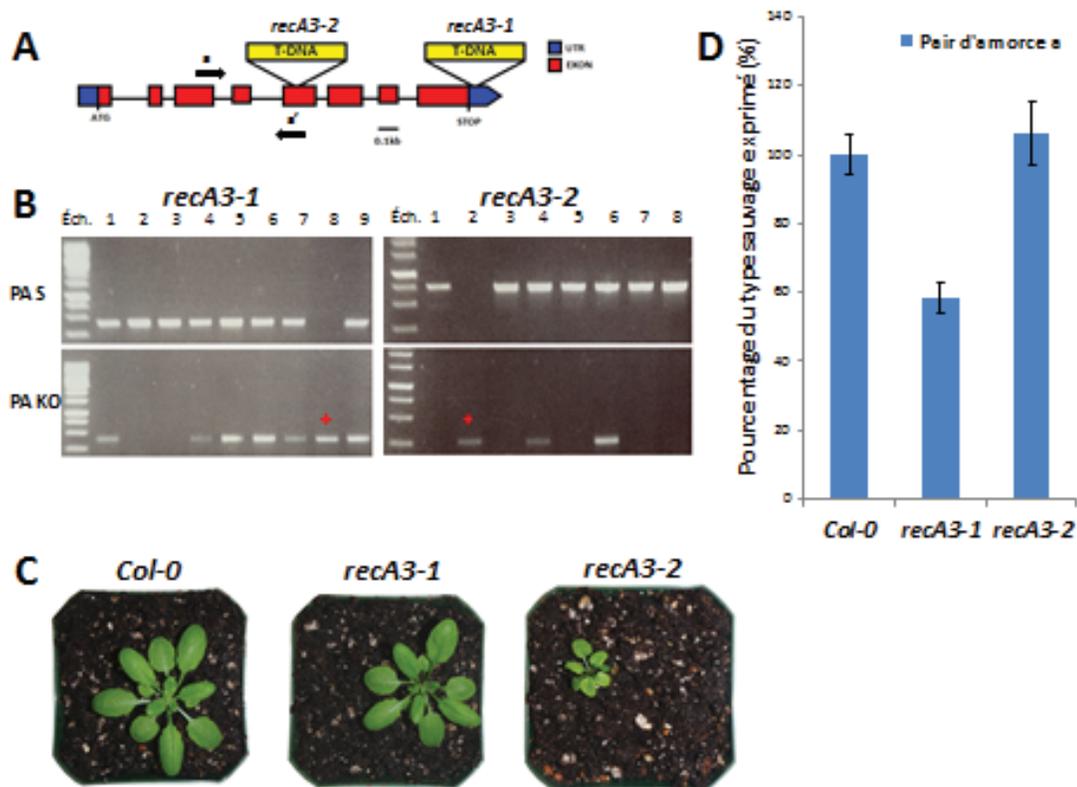


Fig. 5. Isolement des mutants *recA3-1* et *recA3-2*. **A**, Représentation du gène *RECA3*. Les exons sont représentés en rouge, les régions non transcrites aux extrémités en bleu et les introns en noir. Les sites d'insertions des T-DNA sont représentés par la pointe des triangles noirs. Les flèches noires correspondent aux amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR. **B**, Résultat du génotypage ayant mené à l'isolement des mutants. Les chiffres au-dessus de la figure servent à identifier la plante génotypée tandis que le sigle Éch réfère à échelle d'ADN. Les paires d'amorces de type sauvage (PA S) ont été utilisées pour discriminer les lignées mutantes homozygotes des lignées mutantes hétérozygotes. Les paires d'amorces de type knock out (PA KO) ont été utilisées pour détecter les mutants d'insertions T-DNA. Les mutants homozygotes détectés sont identifiés avec une étoile rouge pour chacun des mutants. **C**, Photographies des lignées sauvages et mutantes *RECA3* de la plante *Arabidopsis* âgées de 4 semaines. **D**, Histogramme des résultats de qRT-PCR mesurant les niveaux d'expression de *RECA3* dans les mutants. Ces derniers ont été récoltés après 3 semaines de croissance sur milieu de culture stérile Murashige-Skoog. Les niveaux d'expression des mutants sont représentés en tant que pourcentage relatif à l'expression du même gène chez la plante sauvage Col-0. Les expériences ont été réalisées en triplicata biologiques et en quadriplicata techniques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne des triplicats biologiques.

Isolement des mutants du gène *RECA1*

Dans le but de clarifier le rôle du gène *RECA1*, nous avons entrepris la caractérisation de lignées mutantes. Deux lignées de l'institut SALK ont été obtenues, les lignées *recA1-1* et *recA1-2*. Ces lignées étant également hétérozygotes nous avons semé les graines sur terre et laissé les plantes s'autofertiliser. La progéniture de quelques-unes de ces plantes mutantes a été récoltée et semée de nouveau sur terre afin d'obtenir les mutants homozygotes. Le génotypage des plantes par PCR a permis d'isoler les mutants homozygotes pour les 2 lignées (**Fig. 6B**). À partir des produits PCR générés avec les amorces servant à détecter l'allèle KO, la position exacte des insertions a été établie une fois ces produits purifiés du gel et séquencés. La position exacte à partir du codon initial ATG est de 296 nucléotides (à l'intérieur du 1^{er} intron) pour *recA1-1* et de 2666 nucléotides (à l'intérieur du 11^e exon) pour *recA1-2* (**Fig. 6A**). Sur terre, les mutants *recA1-1* et *recA1-2* ne présentent aucun phénotype le différenciant de la plante sauvage Col-0 (**Fig. 6C**).

Pour évaluer l'effet des insertions dans les mutants *recA1-1* et *recA1-2* sur l'expression du gène *RECA1*, nous avons effectué une expérience de qRT-PCR (**Fig. 6D**). Les résultats attestent que l'expression de *RECA1* dans le mutant *recA1-1* est abolie comparativement au gène de la plante sauvage. L'expression de *RECA1* dans le mutant *recA1-2* se retrouve à environ 13 % du niveau de la plante sauvage. Nous avons donc un mutant, *recA1-1*, KO et un autre mutant, *recA1-2*, KD. Ces mutants sont donc de bons candidats pour étudier le gène *RECA1*.

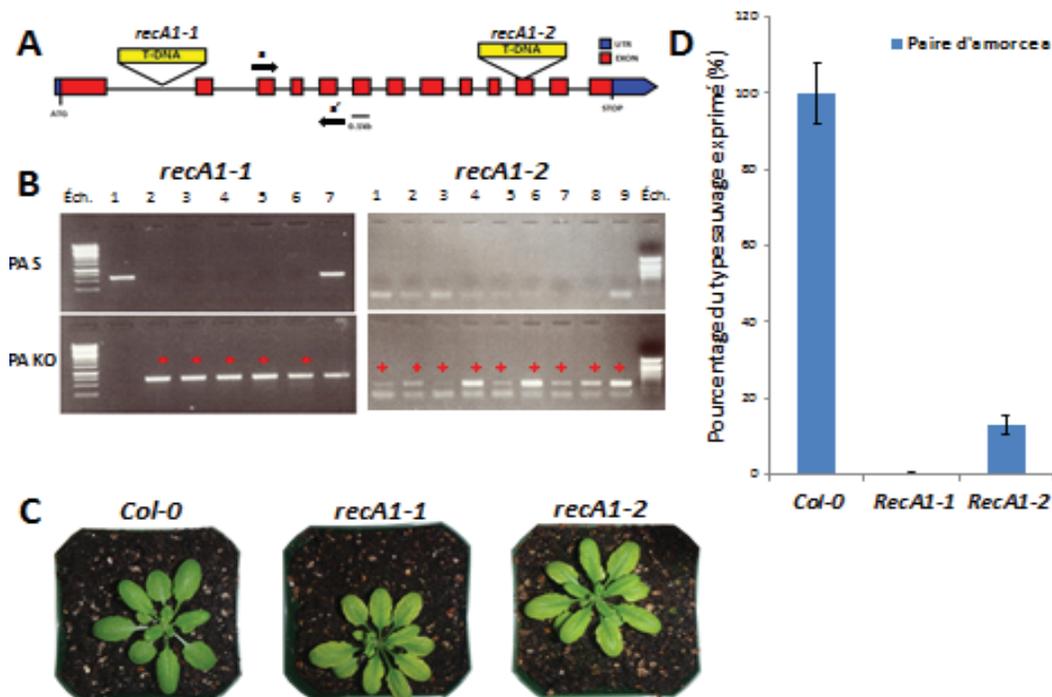


Fig. 6. Isolement des mutants *recA1-1* et *recA1-2*. **A**, Représentation du gène *RECA1*. Les exons sont représentés en rouge, les régions non transcrites aux extrémités en bleu et les introns en noir. Les sites d'insertions des T-DNA sont représentés par la pointe des triangles noirs. Les flèches noires correspondent aux amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR. **B**, Résultat du génotypage ayant mené à l'isolement des mutants. Les chiffres au-dessus de la figure servent à identifier la plante génotypée tandis que le sigle Éch réfère à échelle d'ADN. Les paires d'amorces de type sauvage (PA S) ont été utilisées pour discriminer les lignées mutantes homozygotes des lignées mutantes hétérozygotes. Les paires d'amorces de type knock out (PA KO) ont été utilisées pour détecter les mutants d'insertions T-DNA. Les mutants homozygotes détectés sont identifiés avec une étoile rouge pour chacun des mutants. **C**, Photographies des lignées sauvages et mutantes d'insertion *RECA1* de la plante *Arabidopsis* âgées de 4 semaines. **D**, Histogramme des résultats de qRT-PCR mesurant les niveaux d'expression de *RECA1* dans les mutants *RECA1*. Ces derniers ont été récoltés après 3 semaines de croissances sur milieu de culture stérile Murashige-Skoog. Les niveaux d'expression des mutants sont représentés en tant que pourcentage relatif à l'expression du même gène chez la plante sauvage Col-0. Les expériences ont été réalisées en triplicata biologiques et en quadruplicata techniques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne des triplicats biologiques.

Caractérisation des mutants du gène *RECA1*

Il a déjà été établi que la double mutation *why1why3* entraîne la réparation de bris double brin par le biais d'un mécanisme de recombinaison illégitime, le «*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*» (MMBIR) (8, 9) et que ce mécanisme engendre des réarrangements génomiques majeurs (10, 11). Ce type de réarrangements cause un phénotype de variégation chez environ 5% des plantes mutantes *why1why3* (8). Poussés sur milieu de culture MS sans aucun stress, les mutants *recA1-1* et *recA1-2* présentent également environ 5% de variégation (**fig. 7A**). Cette observation nous a amené à examiner l'état des réarrangements génomiques dans ces plantes. Ceci a été testé en effectuant des PCR utilisant des amorces couvrant la majorité du génome du plastide, espacées d'en moyenne 10 kb et orientées face à face ou dos à dos l'une par rapport à l'autre comme décrit précédemment à la **Figure 4**. Cette technique nous permet de détecter des segments d'ADN dupliqués, circularisés ou délétés par le mécanisme de réparation du MMBIR. Nous observons que les réarrangements sont légèrement plus fréquents comparativement à la plante sauvage (**fig. 8A-B**). Ceci suggère que le gène *RECA1* pourrait être impliqué dans la prévention de recombinaison illégitime par MMBIR dans le génome du plastide au même titre que les Whirlies.

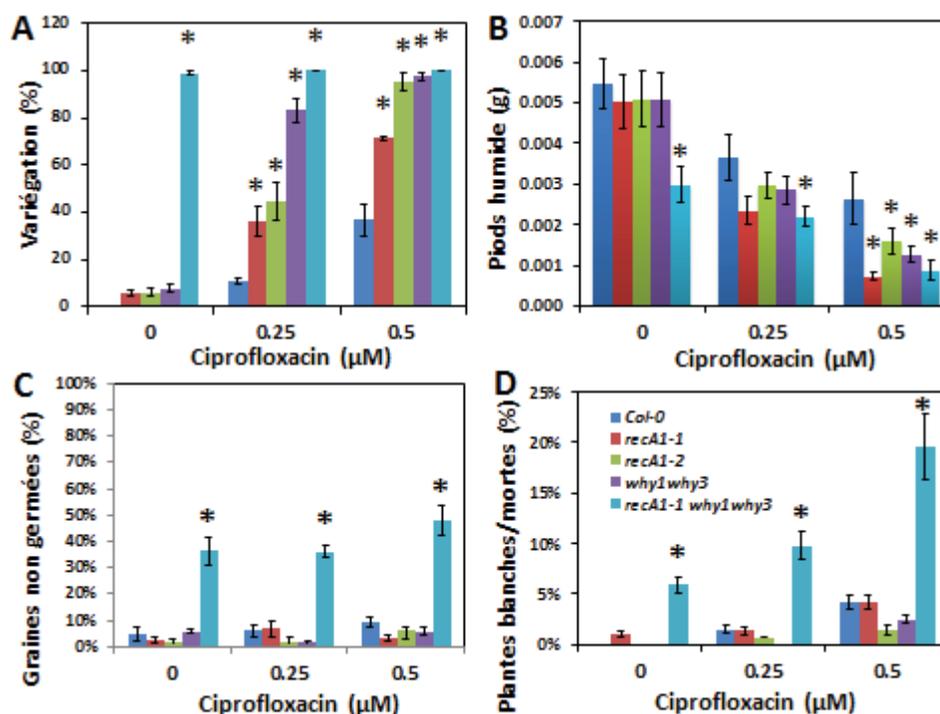


Fig. 7. Effets de la ciprofloxacine sur les différentes lignées mutantes. **A**, Pourcentage de variéation, **B** poids humide en gramme, **C** pourcentage de graines non germées, **D** pourcentage de plantes blanches ou mortes des lignées mutantes et sauvage sur concentrations croissantes de ciprofloxacine. Les astérisques précisent une différence statistique significative pour le test de student t avec un $P < 0.01$ entre la plante sauvage et le mutant. Les bars d'erreur représentent l'écart type entre 4 expériences indépendantes.

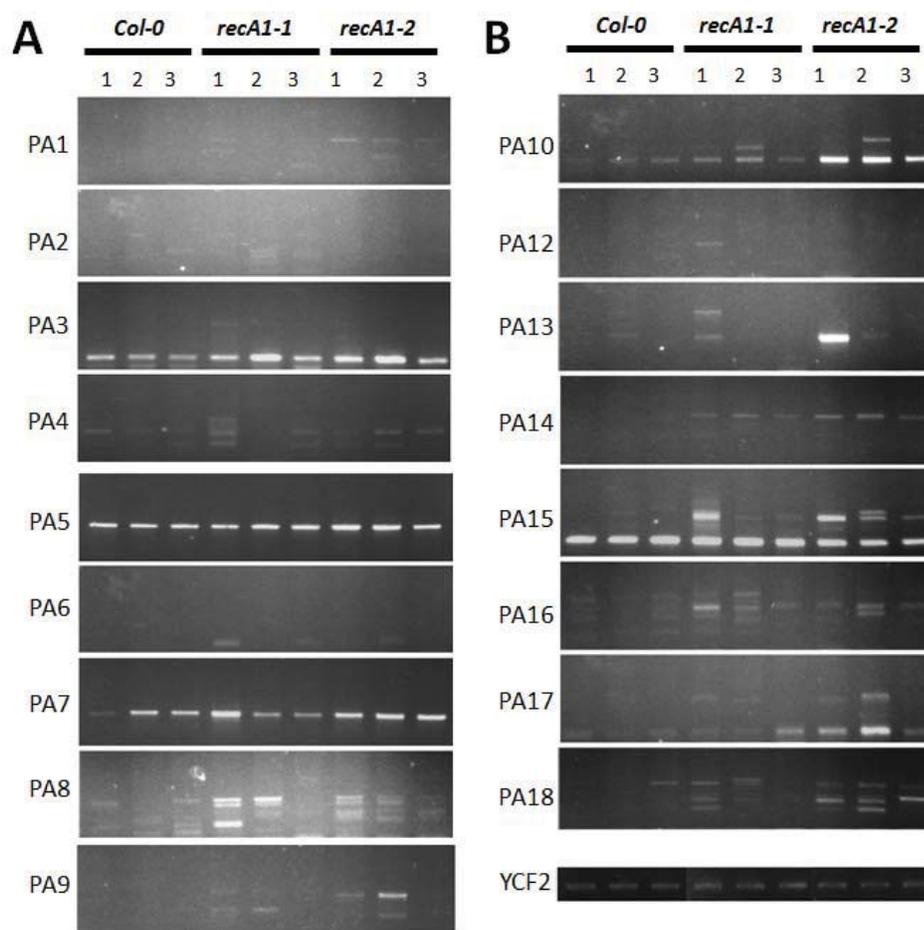


Fig. 8. Recombinaisons illégitimes chez les mutants *recA1-1* et *recA1-2*. Les recombinaisons illégitimes sont légèrement plus fréquentes chez les mutants *recA1-1* et *recA1-2* comparativement à la plante sauvage *Col-0*. Des PCRs ont été effectuées en triplicata biologiques sur les trois lignées. Les paires d’amorces (PA) utilisées sont disposées dos à dos ou face à face sur le génome du chloroplaste (**fig. 4-Supplémentaire 1**). Elles sont espacées en moyenne de 10 kb (**Tableau 2**). Les produits des réactions ont été migrées sur gel d’agarose contenant du bromure d’éthidium. **A-B**, Réactions PCR de chacune des 17 paires d’amorces utilisées. Les paires d’amorces utilisées sont indiquées à gauche de chaque gel, les mutants sont identifiés au haut de la figure. La normalisation des échantillons a été effectuée à l’aide du gène chloroplastique YCF2.

Interaction génétique entre *RECA1* et les gènes *Whirly*

Afin d'évaluer s'il y a une interaction génétique entre les gènes *RECA* et *Whirly* d'*Arabidopsis* nous avons procédé à divers croisements entre nos mutants. Les graines issues du croisement entre *why1why3* et *recA1-1* ont été récoltées et semées sur terre afin d'obtenir un triple mutant homozygote. 108 plantes ont été génotypées par PCR ce qui a permis d'isoler un triple mutant homozygote (**Fig. 9A-C**). La progéniture homozygote pour les trois mutations présente un phénotype de variévation et un retard de croissance accompagné de feuilles ridées (**Fig. 9D**). Les plantes présentent également un poids inférieur comparé aux autres génotypes (**fig. 7B**). Environ 35 % de sa progéniture est incapable de germer (**fig. 7C**). Nous avons confirmé ce résultat en isolant le mutant *recA1-2* x *why1why3* et ce dernier présente les mêmes phénotypes. Nos résultats suggèrent donc que les trois mutations ont un effet synergique. Le reste de la caractérisation du triple mutant a été faite en utilisant la lignée *recA1-1* x *why1why3*.

La variévation étant un phénotype directement associé au MMBIR dans les mutants *why1why3* (8), il est intéressant de constater que le triple mutant *recA1-1* x *why1why3* présente 100% de variévation sur MS comparativement à 5% pour *why1why3* (**fig. 7A**). Afin d'explorer plus profondément la relation génétique entre *RECA1* et les *Whirlies* dans le contrôle du MMBIR, nous avons testé le niveau de réarrangements génomiques par PCR chez les mutants *recA1-1* x *why1why3* et *why1why3* (**fig. 10A-B**). Nos résultats montrent que les mêmes réarrangements observés chez le mutant *why1why3* sont présents chez *recA1-1* x *why1why3* mais en plus grande abondance. À première vue, il semble que *RECA1* contribue au maintien de la stabilité du génome du plastide au même titre que les gènes *WHY1* et *WHY3*. Le fait que le triple mutant montre un phénotype plus sévère que ses parents suggèrent également que *RECA1* agit dans une voie différente des protéines *Whirly*.

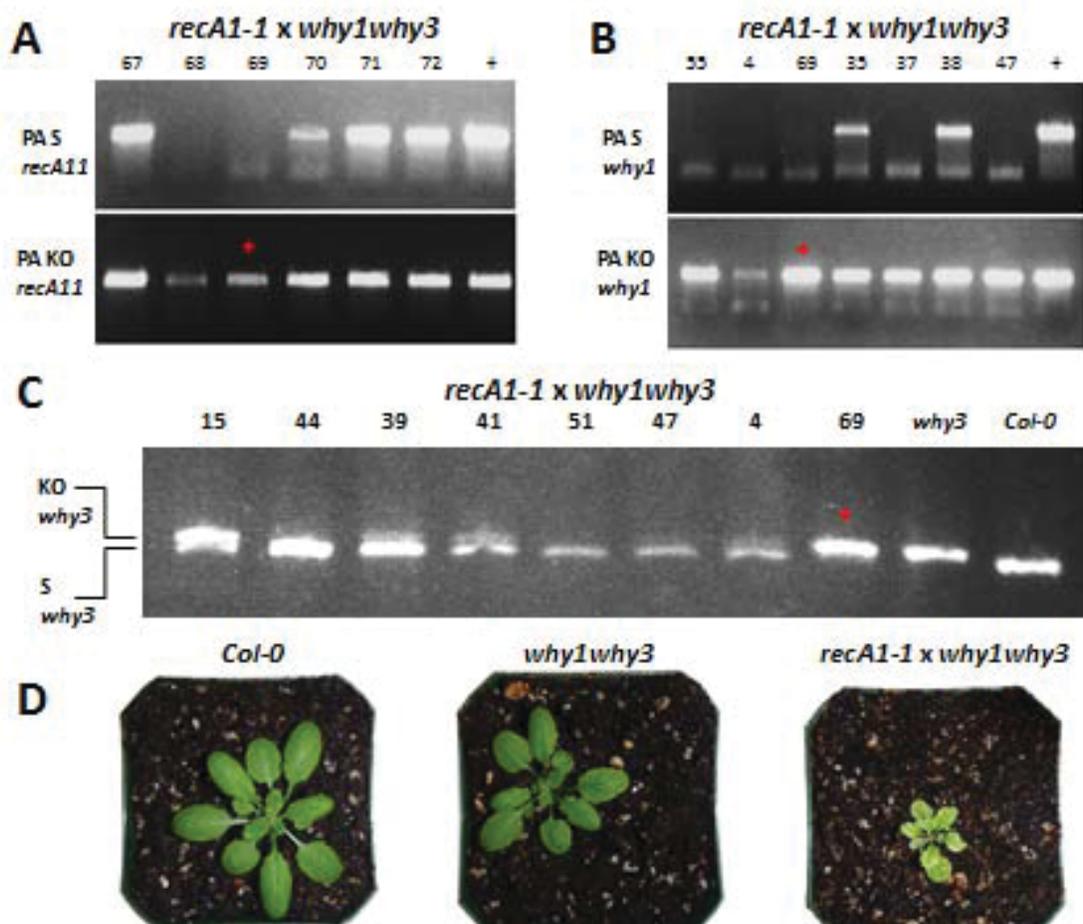


Fig. 9. Isolement du mutant *recA1-1 x why1why3*. A-C, Résultat du génotypage ayant mené à l'isolement de mutants. Les chiffres au-dessus de la figure servent à identifier la plante génotypée. Le symbole + réfère à un contrôle positif. En C, *why3* réfère au contrôle positif et *Col-0* au contrôle négatif. Les paires d'amorces de type sauvage (PA S) ont été utilisées pour discriminer les lignées mutantes homozygotes des lignées mutantes hétérozygotes. Les paires d'amorces de type knock out (PA KO) ont été utilisées pour détecter les mutants d'insertions T-DNA. En C, la digestion d'un produit PCR du gène *WHY3* par l'enzyme *MvaI* permet la discrimination des mutants ponctuels homozygotes de *why3*. La bande au bas du gel identifiée par S *why3* correspond à l'allèle sauvage, celle du haut identifiée par KO *why3* correspond à l'allèle muté. Une seule et unique bande KO *why3* correspond à un mutant homozygote. Les mutants homozygotes détectés sont identifiés avec une étoile rouge. En A l'insertion *recA1-1*, en B l'insertion *why1* et en C la mutation ponctuelle de *why3*. D, Photographies de l'écotype sauvage *Col-0* et du mutant *recA1-1 x why1why3* de la plante *Arabidopsis* âgées de 4 semaines.

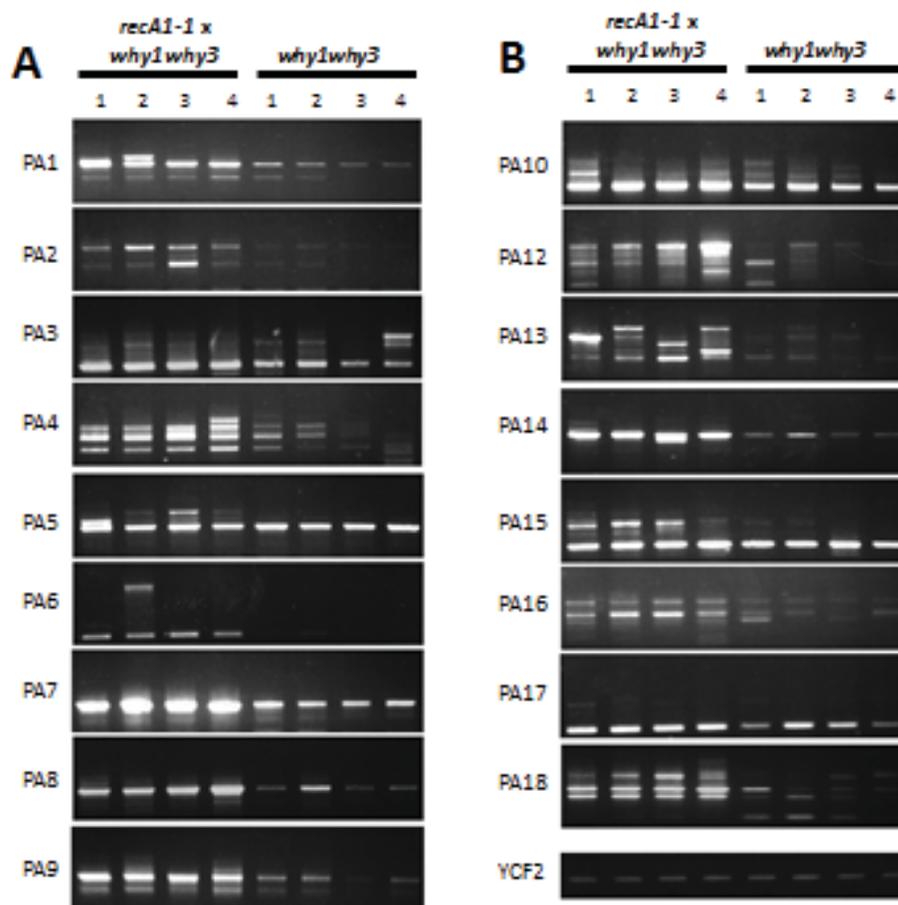


Fig. 10. Augmentations des recombinaisons illégitimes chez le triple mutant *recA1 x why1why3*. A-B, Résultats des PCRs visant à évaluer le niveau de recombinaison illégitime de l'ADN chloroplastique des différents mutants. Les numéros 1 à 4 représentent des échantillons biologiques de chaque mutant *recA1-1 x why1why3* et *why1why3*. Les paires d'amorces (PA) utilisées sont disposées dos à dos ou face à face à travers le génome du chloroplaste (**fig. 4-Supplémentaire 1**). Elles sont espacées en moyenne de 10 kb (**Tableau 2**). Les produits des réactions ont été migrés sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Les paires d'amorces utilisées sont indiquées à la gauche de chaque gel, les mutants sont identifiés au haut de la figure. La normalisation des échantillons a été effectuée à l'aide du gène chloroplastique YCF2.

Susceptibilité des mutants *RECA1* aux dommages à l'ADN

Comme discuter précédemment et illustré à la **Figure 2** la ciprofloxacine inhibe les gyrases ciblées aux chloroplastes ce qui engendre des bris double brin dans l'ADN (12, 13). Il a été établi que le mutant *why1why3* est beaucoup plus varié et accumule significativement plus de réarrangements génomiques lorsque cultivé sur milieu MS suppléé d'une concentration de 0,25 μ Mol de ciprofloxacine (9). Semer des plantes sur ciprofloxacine nous permet donc de détecter les mutants ayant un mécanisme de réparation de l'ADN compromis. Pour confirmer que le gène *RECA1* participe à la réparation de l'ADN plastidique, nous avons soumis les mutants *recA1* à des concentrations de ciprofloxacine croissantes. Nos résultats montrent que les deux lignées *recA1-1* et *recA1-2* sont toutes deux beaucoup plus sensibles à la ciprofloxacine que la plante sauvage en termes de variéation et de poids humide (**fig. 7A, B et Supplémentaire 2**). Ces mêmes lignées comparées au mutant *why1why3* sont légèrement moins sensibles à la ciprofloxacine à 0,25 μ M en terme de variéation, mais aussi sensibles en terme de poids humide. La quantité de graines non germées demeure identique à 0,25 μ M mais augmente à un peu moins de 50 % à 0,5 μ M (**fig. 7C**). La quantité de plantes mortes ou blanches est également augmentée en présence de ciprofloxacine pour le triple mutant. Elle passe de 6 % sans ciprofloxacine à 18 % à 0,5 μ M de ciprofloxacine (**fig. 7D**). Ces résultats suggèrent que le gène *RECA1* a bien une fonction dans la réparation de l'ADN.

Nous avons ensuite effectué une série de PCR pour détecter les réarrangements génomiques chez les mutants *recA1* soumis à la ciprofloxacine. Les résultats montrent que le nombre et l'intensité des réarrangements génomiques sous l'effet de la ciprofloxacine sont similaires à ceux observés chez à la plante sauvage (**fig. 11A-B**). Les résultats montrent aussi que les réarrangements ne diffèrent pas davantage sous l'effet de la ciprofloxacine comparativement à la plante *why1why3* (**fig. 12A-B**). Dans le but de pousser notre étude sur les réarrangements nous avons également testé le triple mutant *recA1-1* x *why1why3* soumis à la ciprofloxacine (**fig. 13A-B**). La quantité de réarrangements génomiques, très élevée si on la compare à la plante sauvage et à la

lignée *why1why3*, demeure sensiblement la même sous l'effet de la ciprofloxacine. Ce résultat vient confirmer que bien que la mutation du gène *RECA1* entraîne une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN, le phénotype engendré n'est pas lié à une augmentation des recombinaisons illégitimes.

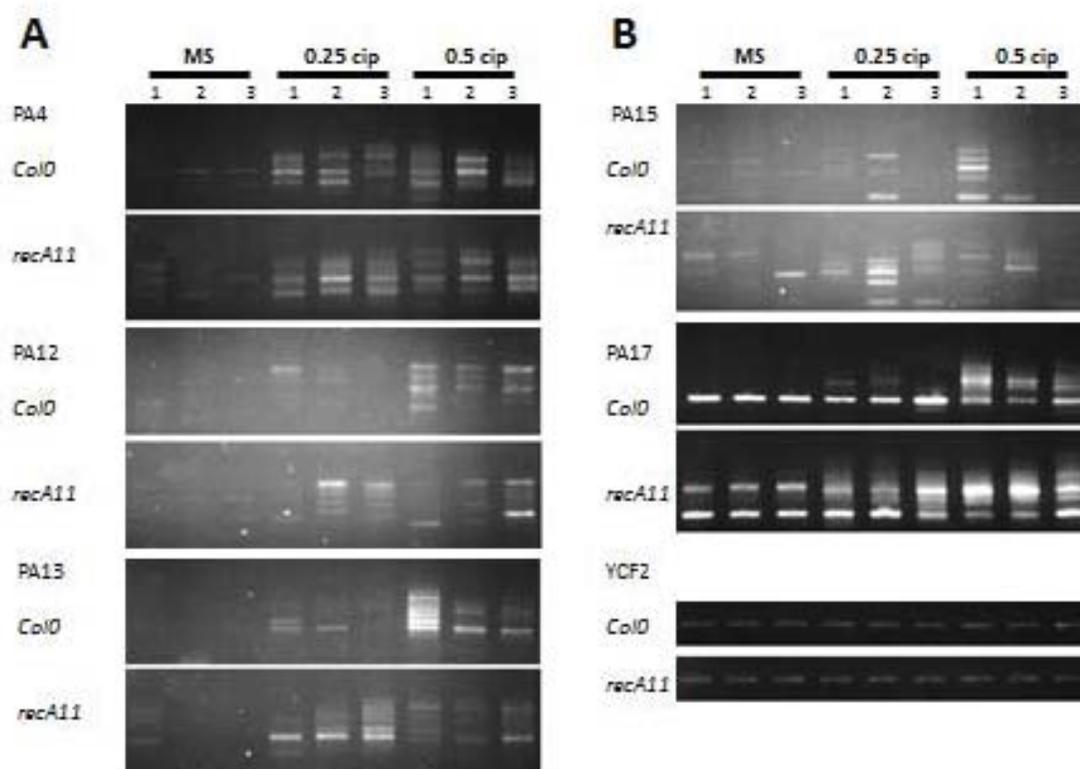


Fig. 11. Les recombinaisons illégitimes, sous l'effet de la ciprofloxacine, chez le mutant *recA1-1*. Celles-ci demeurent sensiblement identiques chez les mutants *recA1-1* comparativement à la plante sauvage *Col-0*. **A-B**, Des PCRs ont été effectuées, en triplicata pour chaque condition, sur la plante sauvage *Col-0* et la lignée mutante *recA1-1*. Ces dernières ont été soumises tout au long de leur croissance à trois concentrations de ciprofloxacine, soit 0, 0,25 uM et 0,5 uM. Les paires d'amorces (PA) utilisées sont disposées dos à dos ou face à face à travers le génome du chloroplaste (**fig. 4-Supplémentaire 1**). Elles sont espacées en moyenne de 10 kb (**Tableau 2**). Les réactions ont été migrées sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. A-F, Réactions PCR de chacune des 17 paires d'amorces utilisées. Les paires d'amorces utilisées sont indiquées à gauche de chaque gel, les mutants sont identifiés au haut de la figure. La normalisation des échantillons a été effectuée à l'aide du gène chloroplastique YCF2.

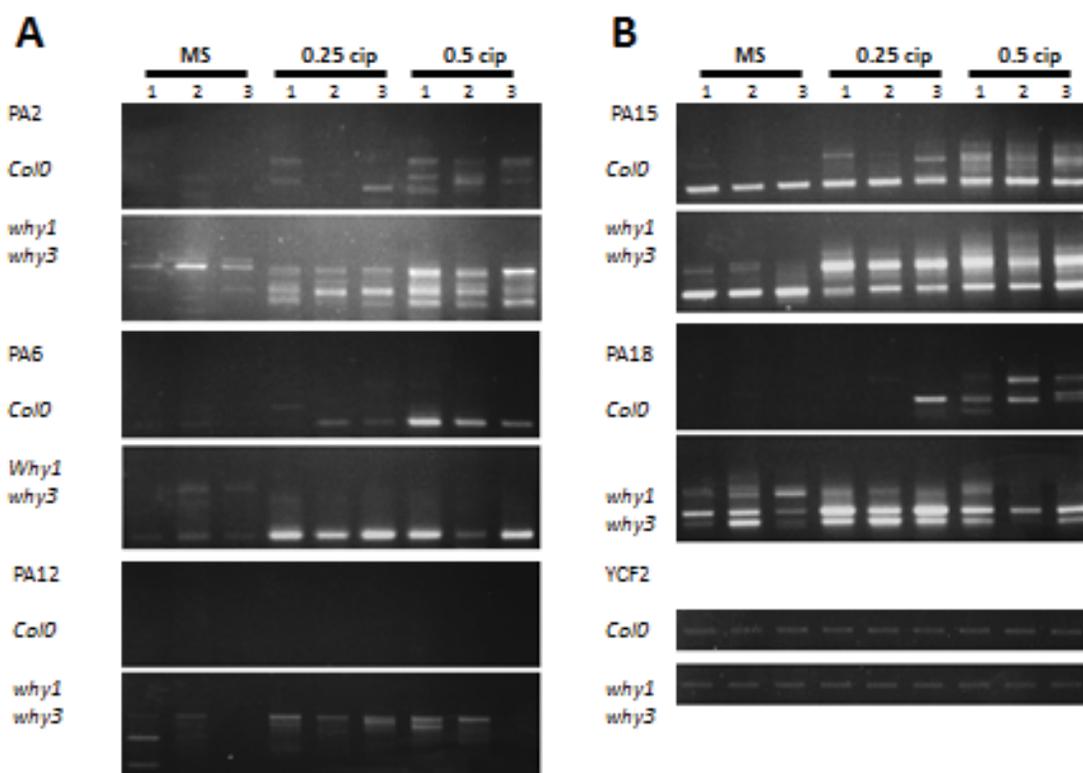


Fig. 12. Les recombinaisons illégitimes, sous l'effet de la ciprofloxacine, chez le mutant *why1why3*. Celles-ci augmentent significativement chez les mutants *why1why3* comparativement à la plante sauvage *Col-0*. **A-B**, Des PCRs ont été effectuées, en triplicat pour chaque condition, sur la plante sauvage *Col-0* et la lignée mutante *whywhy3*. Ces dernières ont été soumises tout au long de leur croissance à trois concentrations de ciprofloxacine, soit 0, 0,25 uM et 0,5 uM. Les paires d'amorces (PA) utilisées sont disposées dos à dos ou face à face à travers le génome du chloroplaste (**fig. 4-Supplémentaire 1**). Elles sont espacées en moyenne de 10 kb (**Tableau 2**). Les réactions ont été migrées sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. A-F, Réactions PCR de chacune des 17 paires d'amorces utilisées. Les paires d'amorces utilisées sont indiquées à gauche de chaque gel, les mutants sont identifiés au haut de la figure. La normalisation des échantillons a été effectuée à l'aide du gène chloroplastique YCF2.

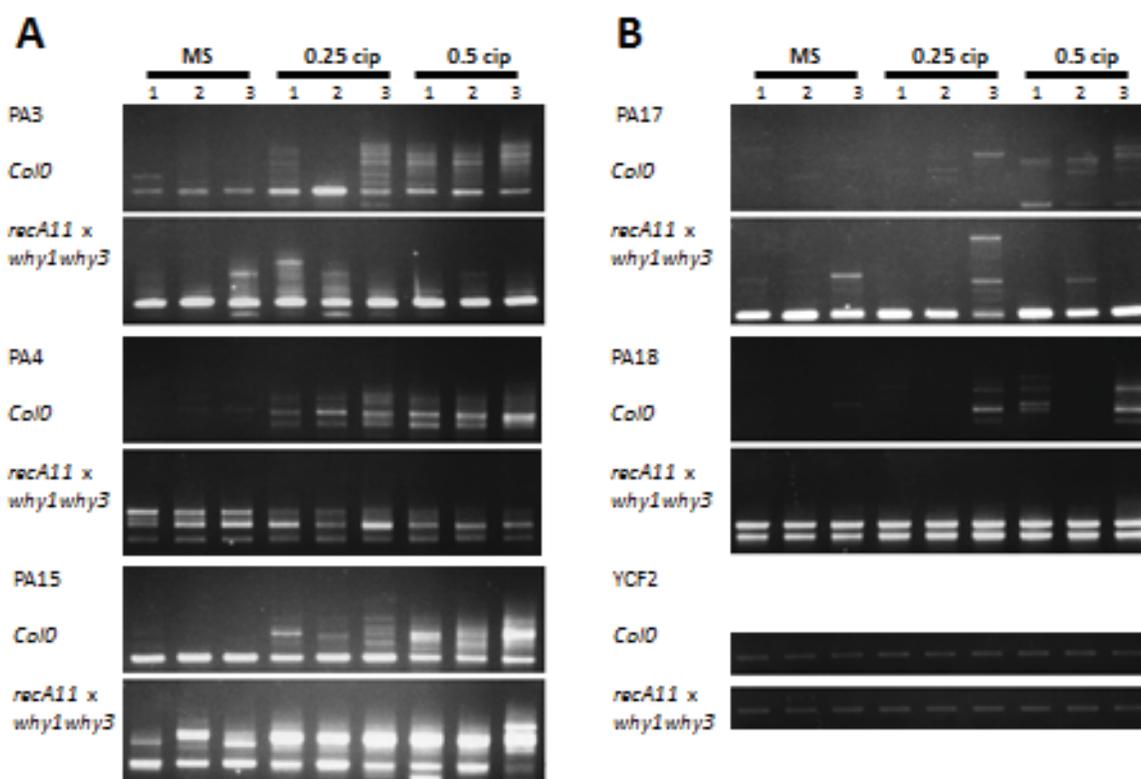


Fig. 13. Les recombinaisons illégitimes sous l'effet de la ciprofloxacine chez le mutant *recA1-1 x why1why3*. Ces recombinaisons augmentent significativement chez les mutants *recA1-1 x why1why3* comparativement à la plante sauvage *Col-0*, mais demeurent identiques sous l'effet de la ciprofloxacine. **A-B**, Des PCRs ont été effectuées, en triplicat pour chaque condition, sur la plante sauvage *Col-0* et la lignée mutante *recA1-1 x why1why3*. Ces dernières ont été soumises tout au long de leur croissance à trois concentrations de ciprofloxacine, soit 0, 0,25 uM et 0,5 uM. Les paires d'amorces (PA) utilisées sont disposées dos à dos ou face à face à travers le génome du chloroplaste (**fig. 4-Supplémentaire 1**). Elles sont espacées en moyenne de 10 kb (**Tableau 2**). Les réactions ont été migrées sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. A-F, Réactions PCR de chacune des 17 paires d'amorces utilisées. Les paires d'amorces utilisées sont indiquées à gauche de chaque gel, les mutants sont identifiés au haut de la figure. La normalisation des échantillons a été effectuée à l'aide du gène chloroplastique YCF2.

Étude du gène *RECA2*

Comme mentionné auparavant, *Arabidopsis thaliana* encode trois RecA c'est-à-dire *RECA3*, *RECA1* et *RECA2*, cette dernière étant ciblée à la fois vers le plastide et la mitochondrie. Deux lignées de l'institut SALK ont été obtenues pour le gène *RECA2*, les lignées mutantes *recA2-1* et *recA2-3*. Les plantes étant hétérozygotes nous avons semé les graines sur terre et laissé les plantes s'autofertiliser. La progéniture de quelques-unes de ces plantes mutantes a été récoltée et semée de nouveau sur terre afin d'obtenir les mutants d'insertion homozygote *recA2-1* et *recA2-3*. Malgré de multiples essais, le génotypage des plantes par PCR n'a pas permis d'isoler les mutants homozygotes pour les 2 lignées (**Fig. 14B**). Les sites d'insertions, selon l'Arabidopsis Biological Resource Center, seraient dans le 6^{ème} intron pour *recA2-1*, le 7^{ème} exon pour *recA2-3* et dans le 8^{ème} exon pour *recA2-4* (**Fig. 14A**). La lignée *recA2-4* a été caractérisée par un autre laboratoire (6) et reviendra brièvement dans la section discussion. Ces résultats suggèrent donc qu'une lignée homozygote pour *RECA2* est non viable.

Étant donné l'importance probable du gène *RECA2* pour la survie de la plante, il devenait tentant de spéculer que ce gène peut compenser pour la perte de *RECA1* dans le plastide chez nos mutants. Pour vérifier ceci, nous avons mesuré l'expression du gène *RECA2*, par qRT-PCR, dans nos deux mutants *recA1-1* et *recA1-2* (**Fig. 14C**). Dans le mutant *recA1-1* l'expression du gène *RECA2* est augmentée d'un peu plus de 50 % comparativement à la plante sauvage. D'un autre côté dans le mutant *recA1-2*, l'expression du même gène reste identique comparativement à la plante sauvage.

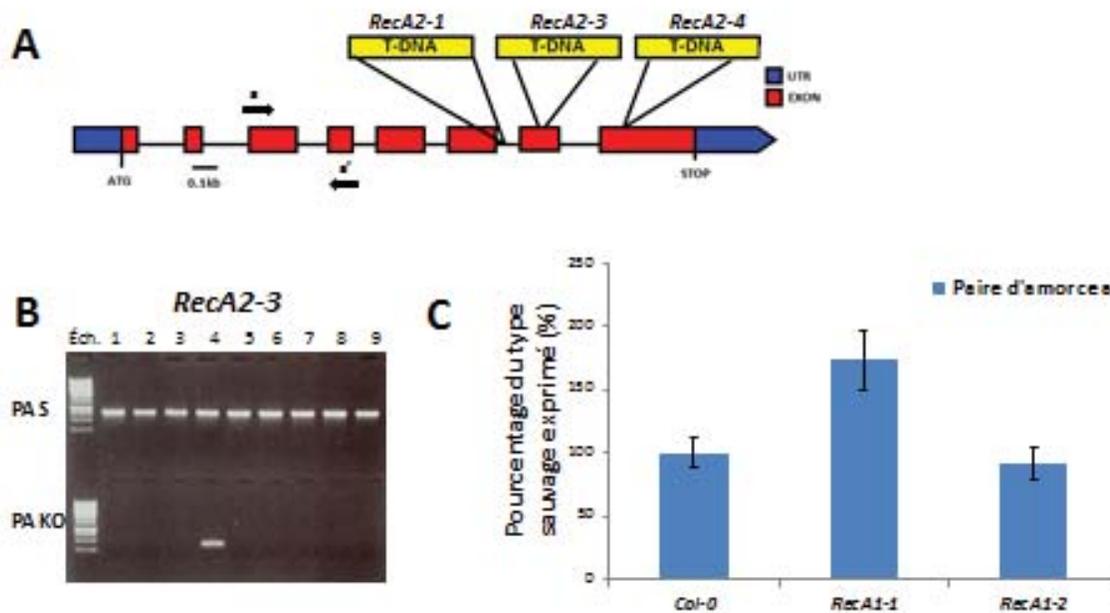


Fig. 14. Isolement des mutants *recA2-1*, *recA2-2* et *recA2-3*. **A**, Représentation du gène *RECA2*. Les exons sont représentés en rouge, les régions non transcrites aux extrémités en bleu et les introns en noir. Les sites d'insertions des T-DNA sont représentés par la pointe des triangles noirs. Les flèches noires correspondent aux amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR. **B**, Résultat du génotypage n'ayant pas mené à l'isolement du mutant *recA2-3*. Les chiffres au-dessus de la figure servent à identifier la plante génotypée tandis que le sigle Éch réfère à échelle d'ADN. Les paires d'amorces de type sauvage (PA S) ont été utilisées pour discriminer les lignées mutantes homozygotes des lignées mutantes hétérozygotes. Les paires d'amorces de type knock out (PA KO) ont été utilisées pour détecter les mutants d'insertions T-DNA. Aucun mutant homozygote n'est détecté. **C**, Histogramme des résultats de qRT-PCR mesurant les niveaux d'expression de *RECA2* dans les mutants *recA1-1* et *recA1-2*. Ces derniers ont été récoltés après 3 semaines de croissance sur milieu de culture stérile Murashige-Skoog. Les niveaux d'expression des mutants sont représentés en tant que pourcentage relatif à l'expression de la plante sauvage Col-0. Les expériences ont été réalisées en triplicata biologiques et en quadruplicata techniques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne des triplicats biologiques.

DISCUSSION

Implication de *RECA3* dans le maintien de la stabilité de la mitochondrie

Les mutants *recA3-1* et *recA3-2* que nous avons caractérisés expriment *RECA3* respectivement à 50% et à 100% de l'expression de la plante sauvage. Il faut noter cependant que, pour cette expérience, la présence du messenger a été testée en utilisant une paire d'amorces placée en amont des deux sites d'insertion. Pour confirmer nos résultats pour la lignée *recA3-2*, nous avons également effectué une qRT-PCR en utilisant des amorces en aval du site de l'insertion (**fig. Supplémentaire 3C**). Il s'avère que l'expression y est également au niveau de la plante sauvage. Néanmoins, il est impossible de conclure si les insertions ont une influence sur le niveau de protéines actives étant donné l'absence d'anticorps contre les protéines RECA de plantes. Il semble malgré tout que le mutant *recA3-2* soit affecté, car il a été démontré lors d'études précédentes que cette lignée a une tendance recombino-génique (6, 14-15) dans la mitochondrie. Il est donc probable que l'insertion *recA3-2* engendre des ARNm tronqués et/ou réarrangés venant perturber la fonction normale du gène.

Implication de *RECA2* dans le maintien de la stabilité du génome plastidique

Nous avons démontré que l'expression de *RECA2* dans le mutant *recA1-1* est augmentée de 50 %. Ce résultat suggère que la perte de *RECA1* peut être compensée par une surexpression de *RECA2*. Cela signifie également que les RECA possèdent des activités au moins partiellement redondantes. Cependant, l'expression de *RECA2* reste inchangée dans le mutant *recA1-2* (**fig. 14C**). Il est possible que l'expression résiduelle de *RECA1* dans le mutant *recA1-2* soit suffisante pour assurer le niveau d'activité RECA nécessaire dans le chloroplaste et ne pas affecter le niveau de *RECA2*. De plus, notre incapacité à isoler un mutant d'insertion pour le gène *RECA2* suggère que la fonction de ce gène est plus importante que la fonction du gène *RECA1*. En effet, une étude précédente avait déjà montré que la perte du gène *RECA2* est délétère pour la plante (15). Récemment, le groupe de Gualberto (6) a caractérisé trois mutants d'insertion de *RECA2* c'est-à-dire *recA2-1*, *recA2-3* et *recA2-4* (**fig. 14A**). Ils ont été incapables d'obtenir des mutants sur

terre, mais *in vitro* les mutants d'insertions de *RECA2* ont pu être obtenus. Ces résultats viennent confirmer l'importance du gène *RECA2* pour la plante.

Il a été démontré que les trois mutants *RECA2* sont incapables de développer des racines et leur croissance s'arrête avant la production de vraies premières feuilles. Il est intéressant d'observer que l'expression de *RECA2* dans les premières semaines de la plante sauvage a lieu principalement au bout des racines en développement, aux extrémités des feuilles et particulièrement à l'apex des feuilles (6). Ces zones chez la plante sont hautement répliquatives et promptes à des bris double brin suivant l'effondrement de la fourche de réplication (22-24). Il est alors tentant d'avancer que *RECA2* possède un rôle critique dans la réplication et la réparation de l'ADN des organelles dans cet environnement prompt aux dommages à l'ADN.

Implication de *RECA1* dans le maintien de la stabilité du génome plastidique

Il fut établi grâce à des expériences *ex vivo* que le génome chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana* contient des régions d'ADN monocaténaire et que l'accessibilité de ces régions à une nucléase est significativement augmentée dans le mutant *recA1-2* (52). Chez la bactérie, la protéine RecA se fixe aux régions d'ADN monocaténaire pour catalyser la réparation par RH tout en prévenant la dégradation de l'ADN par des endonucléases (61). Ceci nous suggère que l'absence de RECA1 dans le chloroplaste augmente le pool d'ADN monocaténaire accessible. Ce raisonnement permet d'expliquer la légère augmentation de réarrangements de type MMBIR observée chez nos mutants *RECA1* comparativement à la plante sauvage (**fig. 8**). Il a déjà été établi par notre laboratoire que la plante sauvage *Arabidopsis thaliana* accumule naturellement bien qu'à de très faibles niveaux, des réarrangements de type MMBIR (8). L'augmentation de MMBIR dans nos mutant *RECA1* est donc probablement un résultat direct de l'accumulation d'extrémités d'ADN monocaténaire non pris en charge dû à l'absence de RECA1. Cet ADN nu permettrait une augmentation des invasions de brins d'ADN guidés par des microhomologies et RECA-indépendante (11).

Ces résultats nous informent que *RECA1* est impliqué dans un mécanisme qui limite la quantité de réarrangements de type MMBIR. Nous ne pouvons cependant pas conclure à une implication directe dans la prévention de réarrangements, car il pourrait très bien s'agir d'une voie de réparation parallèle qui est compromise chez les plantes mutantes. Étant donné le rôle bien connu des RecA bactériennes, il devient alors tentant de conclure que la protéine RECA1 est effectivement impliquée dans l'échange de brins homologues entre deux duplex d'ADN. La mutation de *RECA1* canaliserait donc les bris de l'ADN vers des voies de réparation non conservatrices comme le MMBIR. Cette première hypothèse nous permet d'expliquer les phénotypes de variéation et de réarrangements que nous observons chez les mutants *recA1-1* et *recA1-2*.

Alternativement, d'autres mécanismes plus complexes ont été récemment établis dans d'autres systèmes et pourraient également expliquer nos résultats. Par exemple, la réparation de bases mutées chez *E. coli* est promue par l'utilisation de RecA qui catalyse la formation d'une fourche de réplication inversée (40) (**fig. 3b**). Au cours de cette réaction, deux larges boucles d'ADN monocaténaire sont générées et seulement l'une d'elles est chargée de recombinaise A (40). Ainsi ce mécanisme génère un substrat qui pourrait être potentiellement ciblé par une microhomologie. Un autre de ces mécanismes génère une boucle D, à la manière de RecA, directement sur le brin indirect d'une fourche réplivative (12, 144) (**fig. 3a**). La fourche réplivative offre elle aussi plusieurs substrats monocaténaires potentiellement susceptibles aux invasions par des microhomologies. Advenant que ces mécanismes soient conservés dans le chloroplaste et que RECA1 y soit requis ceci pourrait aussi expliquer la légère augmentation de MMBIR que nous observons au niveau des mutants *recA1-1* et *recA1-2* (**fig. 8**). Par contre si on considère que RECA1 produite chez *E. coli* peut compléter partiellement l'absence de RecA (63-64) et qu'inversement, la protéine RecA de *E. coli* peut partiellement compléter la perte de la protéine RECA chloroplastique de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (7), il devient facile d'imaginer que RECA1 occupe également des fonctions traditionnelles dans la RH.

De plus, la structure du génome chloroplastique apparaît comme un embranchement chaotique de concaténaire et de monomères circulaires ou linéaires (26, 53-58). Il a

aussi été remarqué que le mutant *recA1-2* accumule beaucoup plus d'ADN simple brin que la plante sauvage dans ses chloroplastes (52). Étant donné que les protéines RecA peuvent interagir à la fois avec une séquence d'ADN simple brin et avec de l'ADN double brin il pourrait être possible que RECA1 ait un rôle servant à maintenir la structure des embranchements du génome chloroplastique ensemble. Ce rôle hypothétique plus structural pourrait aussi expliquer l'instabilité génomique que nous observons dans les mutants *recA1* (**fig. 8**).

Effet de la ciprofloxacine sur l'ADN chloroplastique des mutants du gène *RECA1*

La ciprofloxacine cible spécifiquement les gyrases des organelles après que ces dernières aient ouvert l'ADN bicaténaire pour relaxer sa forme super enroulée (12, 13). Les gyrases bactériennes sont connues pour agir en aval des fourches de réplication et leur inhibition cause l'effondrement de celles-ci (31). Au cours de notre étude, nous avons pu confirmer que les mutants *RECA1* sont sensibles à la ciprofloxacine (**fig. 7A-B, 11**) tout comme le mutant *why1why3* (9). Il a précédemment été démontré que le mutant *why1why3* présente considérablement plus de réarrangements de type MMBIR sous l'effet de la ciprofloxacine comparativement à la plante sauvage (**fig. 12**). Ceci est dû à l'absence des protéines Whirly qui lient l'ADN simple brin et empêchent les mauvais appariements entre microhomologies menant à la réparation non conservatrice de l'ADN. Il est cependant surprenant de constater qu'à l'inverse du mutant *why1why3*, les mutants *recA1-1* et *recA1-2* présentent la même quantité de réarrangements MMBIR que la plante sauvage sous l'effet de la ciprofloxacine (**fig. 11**). Nous en concluons que chez les mutants *RECA1*, les protéines Whirly toujours présentes permettent d'éviter la réparation non conservatrice de type MMBIR en grande partie.

Cependant, nos observations précédentes concernant les quelques produits de recombinaison de plus détectés en absence de ciprofloxacine chez les mutants de *RECA1* (**fig. 8**) suggèrent que les protéines Whirly n'ont pas toujours la possibilité de parer à la recombinaison illégitime (**fig. 12**). Cette constatation suggère que la légère accumulation de MMBIR sur MS dans les mutants *recA1-1* et *recA1-2* n'est pas

attribuable à des bris double brin dans l'ADN, mais plutôt à l'apparition d'une nouvelle forme d'ADN recombinogénique. Ces résultats sont donc plutôt en ligne avec notre hypothèse proposant un rôle pour les RECA dans l'inversement d'une fourche répllicative bloquée. En l'absence de RECA1, ces fourches de répllication bloquées ne pourraient pas être prises en charge par les protéines Whirly pour des raisons inconnues et deviendraient des substrats pour la recombinaison illégitime. Cette interprétation nous permet donc de réconcilier la légère augmentation (relative à la plante sauvage) de produits MMBIR chez les simples mutants et l'absence d'augmentation en présence de ciprofloxacine. Ceci représente également une première indication selon laquelle RECA1 participe à un mécanisme de réparation de l'ADN différent de celui auquel contribuent les protéines Whirly.

Ces résultats montrent également que la protéine RECA1 est essentielle dans la réparation des bris de l'ADN, probablement par RH, car les mutants RECA1 sont définitivement plus sensibles à la ciprofloxacine que la plante sauvage (**fig. 7A-B, 11**). Nous avons observé un sévère retard de croissance et une augmentation de la variéation. L'effet de la ciprofloxacine sur la structure du génome des chloroplastes a été étudié chez la plante sauvage et chez le mutant *recA1-2*. Une quantité réduite d'ADN chloroplastique est observée dans la plante sauvage sous l'effet de la ciprofloxacine (52). De plus, l'ADN des plantes sauvages traitées présente une structure moins complexe qu'en temps normal et qui ressemble plutôt à ce qui est observé chez le mutant *recA1-2*. Ce résultat suggère que la ciprofloxacine engendre une perte d'information génétique à cause des cassures double brin qu'elle occasionne et que le chloroplaste ne peut réparer adéquatement. Ces résultats indiquent qu'en l'absence de *RECA1*, une quantité importante de bris double brin sont accumulés et ne sont pas réparés aussi rapidement que chez la plante sauvage. La relation de RECA1 avec les protéines Whirly serait donc indirecte puisque ces dernières agissent dans une voie différente, mais néanmoins parallèle. Cette hypothèse a donc été testée en réalisant les croisements entre les différents mutants.

RECA1 est impliqué dans une voie de réparation différente des protéines Whirly

Pour investiguer la relation épistatique des gènes *RECA1* et *Whirly* nous avons produit un triple mutant *recA1-1 x why1why3*. L'émergence d'un phénotype plus grave chez ce mutant que les phénotypes de ses parents (**fig. 7, 9D**) suggèrent que les protéines Whirly ne sont pas impliquées dans la même voie que RECA1 ou que l'une de ces protéines agit dans la même voie mais aussi dans une autre. Si les protéines avaient été impliquées dans la même voie, les phénotypes de *recA1-1*, *recA1-2*, *why1why3* et *recA1-1 x why1why3* auraient tous été identiques en gravité. Il semble donc fort probable que nous ayons perturbé deux voies distinctes, toutes deux ayant comme but le maintien de la stabilité génomique des organelles. Parallèlement, nous avons pu observer une augmentation extrême de réarrangements du génome dans le triple mutant *recA1-1 x why1why3* comparativement au double mutant *why1why3* (**fig. 10**), ce que nous pensons être également dû à la perturbation de deux voies de réparation distinctes. L'effet cumulatif suggère que l'absence de *RECA1* et des Whirly libère une quantité importante d'ADN monocaténaire recombinogénique qui ne peut alors être réparé que par des voies non conservatrices. De plus, le mutant *recA1-1 x why1why3* nous informe que *RECA2* ne suffit pas à sauvegarder la voie de réparation à laquelle *RECA1* participe. Les résultats de l'étude du triple mutant *recA1-1 x why1why3* sont donc en ligne avec notre hypothèse quant à la fonction de *RECA1* dans les voies de réparations conservatrices de l'ADN. Nos résultats soulignent une fois de plus la différence quant aux mécanismes dans lesquels les RECA et les Whirlies sont impliqués.

Récemment, notre groupe a proposé que les protéines Whirly ciblées au chloroplaste pourraient remplir le rôle des protéines SSB au moins en ce qui a trait à la réparation de l'ADN (9). En effet, outre leurs structures tertiaires similaires, ces deux familles de protéines partagent plusieurs éléments en commun : elles forment toutes deux des tétramères qui lient l'ADN monocaténaire avec une grande affinité, elles utilisent principalement des résidus hydrophobes/aromatiques pour effectuer leur contact avec l'ADN monocaténaire et de ce fait leur liaison demeure robuste même en présence de sels, elles peuvent déstabiliser l'ADN bicaténaire, elles peuvent prévenir la dégradation

de l'ADN monocaténaire par des nucléases et finalement, elles possèdent une extrémité C-terminale acide/aromatique (45, 48-49). Nos résultats obtenus grâce au triple mutant *recA1-1 x why1why3* nous indiquent cependant que les protéines Whirly ne sont pas impliquées dans la même voie de réparation que la protéine RECA1. Nos conclusions nous amènent donc à proposer que l'ADN monocaténaire traditionnellement pris en charge par les SSB lors de la RH chez la bactérie, tel que décrit aux **Figures 1 et 3**, n'est pas pris en charges par les Whirly dans le chloroplaste. L'ADN monocaténaire généré lors de la RH suivant la résection en 5' par une exonucléase dans un cas (**fig. 1**) et suivant la production de boucle d'ADN monocaténaire (**fig. 3**) dans l'autre doit donc être pris en charge par une autre protéine qui reste inconnue à ce jour.

Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du chloroplaste par les RECA

Nous proposons ici un modèle pour expliquer le rôle des *RECA* chez *Arabidopsis thaliana* dans le maintien de la stabilité du génome du plastide. Il est basé en grande partie sur les mécanismes de réparation de l'ADN impliquant RecA chez la bactérie vu le manque d'information regardant les organelles de plantes. Nous proposons le modèle à la **Figure 3B** où nous illustront un mécanisme de réparation de l'ADN où les protéines RECA jouent un rôle central sans aucune contribution de la part des Whirly. Nous spécifions un rôle à *RECA* qui permet d'expliquer pourquoi les mutants du gène *RECA1* accumulent légèrement plus de réarrangements sur milieu de culture MS, mais autant que la plante sauvage sur ciprofloxacine.

La **Figure 3B** propose un mécanisme de réparation où une fourche réplivative rencontre une base mutée ou mal appariée dans l'ADN. Dans ce modèle, l'hélicase passe au-dessus de la paire de bases endommagée, continue à dérouler l'ADN avant de s'arrêter de 100 pb à 3000 pb plus loin. De son côté, la polymérase s'arrête aussitôt qu'elle rencontre une structure anormale. Des protéines s'apparentant aux SSB sont alors chargées sur l'ADN monocaténaire resté nu entre l'hélicase et la polymérase afin de prévenir de mauvais appariements et des dommages par les nucléases. Les protéines SSB qui sont présentes sur le brin indirect sont remplacées par des amorces déposées par

une primase et le brin d'ADN indirect redevient bicaténaire. Les RECA viendront ensuite déplacer les protéines SSB, soit directement ou par l'intermédiaire d'une protéine inconnue responsable de charger RECA sur l'ADN occupé par les SSB. La protéine RECA sera alors en mesure de catalyser la formation d'une fourche de réplication inversée. Le complexe responsable du MMR, du NER ou du BER viendra réparer la mutation. Finalement une résolvasse viendra couper cette fourche de réplication inversée (40-41). Les produits d'ADN bicaténaire résultant seront pris en charge par le mécanisme de RDR décrit à la **Figure 1d** et reformeront une fourche répliative. Ce modèle, a été établi chez la bactérie où RecA est d'ailleurs essentiel afin de relâcher le complexe de réplication entourant la polymérase et de redémarrer la fourche répliative (40-41).

Ce modèle expliquerait pourquoi les mutants *recA1-1* et *recA1-2* accumulent plus de réarrangements illégitimes comparés à la plante sauvage (**fig. 8**). L'absence de RECA engendrerait la formation d'une boucle d'ADN monocaténaire pouvant facilement servir de substrat au MMBIR. En d'autres mots, l'absence des RECA dans ce modèle favoriserait l'appariement d'une séquence microhomologue sur le brin direct d'ADN monocaténaire. Ce modèle expliquerait aussi pourquoi le mutant *recA1-1* n'accumule pas autant de réarrangements sous l'effet de la ciprofloxacine que le mutant *why1why3*; le mécanisme présenté à la **Figure 3d** n'est pas utilisé pour parer aux bris double brin causés par la ciprofloxacine, mais plutôt aux paires de bases mutées.

Maintien de la stabilité du génome du chloroplaste par les Whirly

L'absence des Whirly dans le chloroplaste engendre une augmentation significative de réarrangements de types MMBIR (8-9). Conséquemment, le mutant *why1why3* est sensible à la ciprofloxacine qui engendre des bris double brin dans l'ADN des organelles (**fig. 12**). Ces résultats démontrent que les Whirly empêchent les réarrangements illégitimes de type MMBIR d'avoir lieu. Le modèle par lequel le mécanisme d'action des protéines Whirly est décrit (8-9) implique que ces dernières se lient à l'ADN simple brin généré immédiatement par la résection de l'ADN en 3' par

une exonucléase tel qu'illustré à tous les modèles de la **Figure 1**. L'idée générale étant que les Whirly empêcheront un réarrangement de type MMBIR d'avoir lieu et permettra la réparation d'un bris double brin dans l'ADN à travers un mécanisme de réparation fidèle. Or, si nous considérons le phénotype sévère du triple mutant *recA1-1 x why1why3* nous sommes forcés de reconsidérer la contribution des protéines Whirly au phénomène de RH. Il semble en effet que les protéines WHY1 et WHY3 agissent dans une voie différente de la protéine RECA1.

D'une part les Whirly pourraient diriger la réparation légitime de l'ADN vers une voie différente de la RH ou même vers une voie alternative de RH n'impliquant pas RECA1 (RECA2 par exemple). D'une autre part, les Whirly ne semblent pas remplacer les protéines SSB dans leur fonction au niveau de la RH. Malgré ce, il est possible que les Whirly soit les premières protéines recrutées à l'ADN simple brin afin de protéger l'ADN de réarrangements illégitimes de type MMBIR mais qu'elles soient remplacées éventuellement par des protéines jouant le rôle des SSB amenant ainsi la réparation vers la RH. Il est important de noter que les protéines Whirly (34-35), au contraire des protéines RECA (71-76), n'ont pas besoin d'être activement recrutées par d'autres protéines pour lier l'ADN simple brin. Pour cette raison il est tentant d'avancer que ce sont les Whirly qui se lient à l'ADN simple brin avant tout autre protéine surtout si on considère que c'est le mutant *why1why3* qui accumulent le plus de réarrangements lorsque les bris double brin dans l'ADN abondent. C'est une considération importante à prendre en compte, car elle pourrait induire en erreur l'interprétation que l'ont fait de notre triple mutant. Ici les Whirly seraient impliquées dans la prévention du MMBIR et serait complices à la voie de la RH sans nécessairement la promouvoir directement. D'une manière ou d'une autre, il est clair que dans le mutant *recA1-1 x why1why3* la RH est compromise et la réparation par MMBIR favorisée.

Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du plastide par les RECA face aux bris d'ADN

Inspiré par le modèle de réparation de l'ADN bactérien, le modèle à la **Figure 15A** présente un mode d'action par lequel les protéines *RECA* d'*Arabidopsis* assurent le maintien de la stabilité suite à la rencontre d'un bris double brin ou simple brin dans l'ADN. Deux brins d'ADN bicaténaire sont formés à partir du brin direct et indirect de la fourche de réplication. Une exonucléase effectue alors une résection sur l'ADN en 5'. Pour éviter des réarrangements de type MMBIR les protéines Whirly iraient se fixer à l'ADN monocaténaire (8-9). Éventuellement, les Whirlies quittent l'ADN simple brin et sont remplacées par des protéines s'apparentant aux SSB bactériennes pour faciliter le recrutement des protéines RECA. Les protéines de type SSB seraient alors déplacées activement de l'ADN simple brin de la même manière que les protéines SSB bactériennes sont déplacées par les partenaires de RecA. Les RECA vont ensuite promouvoir une recherche d'homologie sur une copie du génome chloroplastique intacte (34-35). Finalement les protéines *RECA* favorisent l'invasion du brin d'ADN monocaténaire dans le duplex d'ADN trouvé. Il y aurait alors formation du réplisome, synthèse de l'ADN et résolution de la jonction de Holliday. La fourche répllicative est désormais repartie. Ce mécanisme diffère du modèle de réparation des bris double brin chez la bactérie d'un seul élément. Dans ce modèle, l'implication des protéines Whirly est strictement passive, mais permet néanmoins de prévenir le MMBIR. L'action de *RECA* telle que décrite dans le modèle a déjà été décrite de la sorte chez la bactérie tant au niveau de la recherche d'homologie, de l'invasion d'une séquence bicaténaire homologue et du recrutement à l'ADN monocaténaire (37). D'ailleurs ce modèle, inspiré du RDR, place *RECA* tel que généralement décrit dans ce mécanisme chez la bactérie (38-39).

Le modèle à la **Figure 15B** explique comment en l'absence des Whirly, beaucoup plus de réarrangements de type MMBIR ont lieu. Ce modèle suggère aussi que la présence des protéines Whirly est suffisante pour parer à la mauvaise réparation des bris double brin causé par la ciprofloxacine advenant que la voie associée à RECA1, soit compromise. Au modèle présenté à la **Figure 15B** les produits d'un bris double brin

sont résectés par une exonucléase mais ne sont pas pris en charge immédiatement par les Whirly. Une courte séquence d'ADN simple brin trouve une seconde séquence d'ADN homologue dans un duplex d'ADN à proximité, une microhomologie. Un échange de brin prend alors lieu de manière RECA indépendante. La réplication de l'ADN peut ensuite avoir lieu comme décrits à gauche à la **Figure 15A**. Parce que la réplication de l'ADN peut avoir lieu avec des microhomologies aussi courtes que 3 paires de bases (59), les appariements des microhomologies à un duplex d'ADN provoquent des événements de recombinaison qui seront souvent illégitimes, en fonction de la longueur de cette microhomologie. Ainsi l'absence des Whirly augmente les réarrangements de type MMBIR malgré la présence de mécanisme de réparation de l'ADN fidèle. En dépit de la présence de *RECA2*, dans le cas où *RECA1* est muté et les Whirly sont absentes, toutes les réparations sont alors effectuées par les voies de réparation non conservatrices, ce qui produit alors l'abondance de produits de recombinaison observée dans le triple mutant.

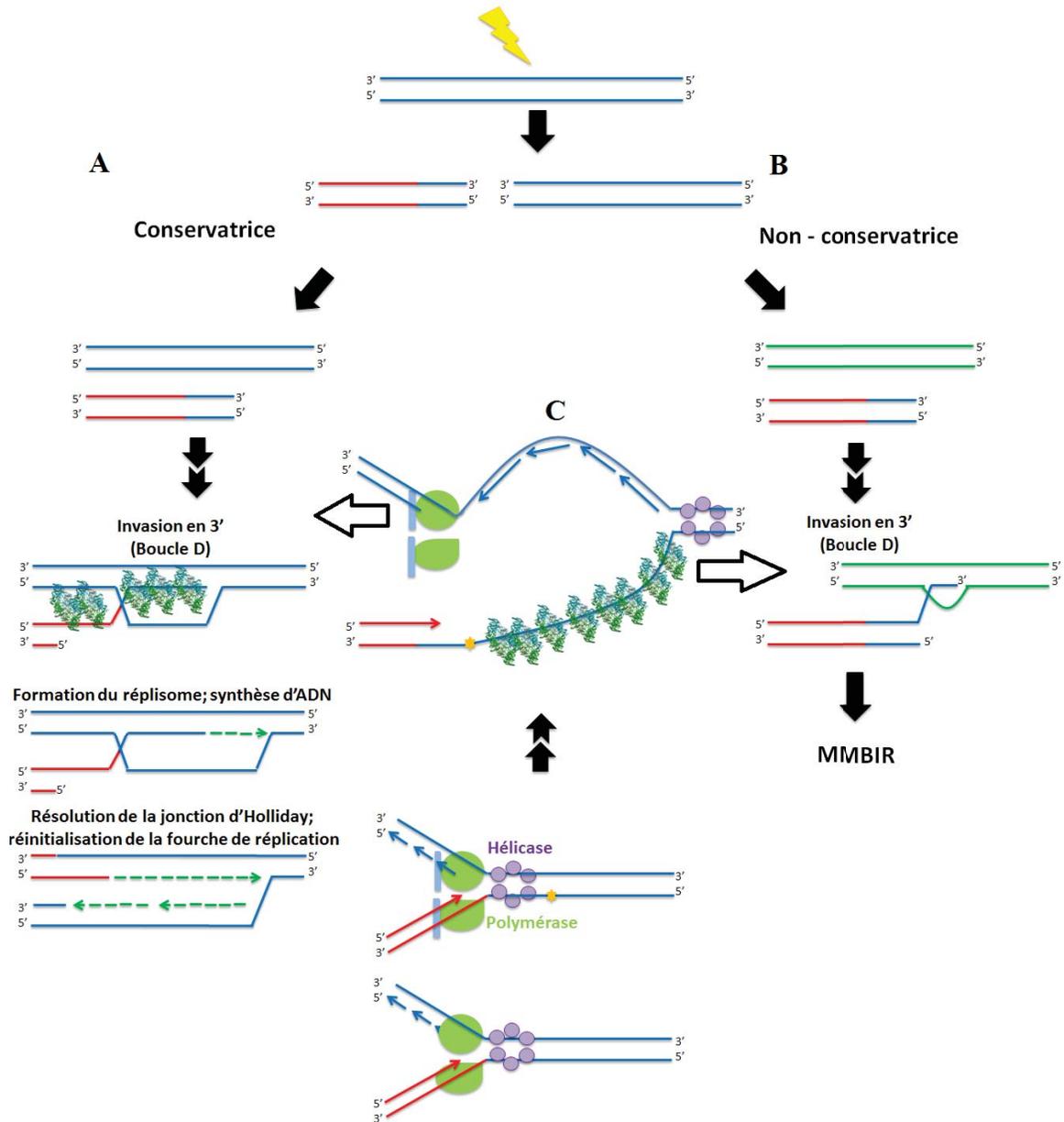


Fig. 15 Modèle pour le maintien de la stabilité du génome du plastide par les RECA en réponse aux bris d'ADN. **A**, Voie de réparation conservatrice du RDR. **B**, Voie de réparation non-conservatrice typiquement prise en charge par les Whirly. **C**, Rencontre d'un dommage à l'ADN par une fourche répliquative (au bas de la figure) et formation d'une boucle d'ADN monocaténaire (au centre de la figure) pouvant être redirigée vers un mode de réparation conservateur à gauche et non-conservateur à droite tout dépendant de la présence des protéines RecA sur le brin direct. Cette figure est inspirée de *Marechal & Brisson 2010* (10), de *McInerney et al. 2007* (40) et de *Cappadocia et al. 2010* (9).

Réparation de l'ADN du chloroplaste en l'absence des acteurs Whirly et RECA1

Les deux modèles proposés jusqu'à maintenant (**fig. 15A-B**) expliquent bien les résultats que nous avons obtenu pour les mutants *recA1-1* x *why1why3* et *why1why3*. Ces modèles n'expliquent pas cependant l'augmentation du MMBIR dans les simples mutants *recA1-1* et *recA1-2* sur milieu de culture MS (**fig. 8**) et l'absence d'augmentation de ces produits de recombinaison sous l'effet de la ciprofloxacine comparativement à la plante sauvage (**fig. 11**). Nous reprenons le modèle préalablement proposé (**fig. 3**) pour expliquer cette divergence et l'avons intégré au modèle de la **Figure 15** où il peut retourner à la voie de RDR (**fig. 15A**) ou offrir une cible aisée à une microhomologie dans la réparation illégitime (**fig. 15B**).

L'absence des protéines WHY1, WHY3 et RECA1 engendre deux circonstances différentes où de l'ADN simple brin est généré (**fig. 15B-C**). Dans un cas l'absence de RECA1 engendre des boucles d'ADN monocaténaire plus accessible aux réarrangements que de l'ADN bicaténaire surenroulé (**fig. 15C**). Dans l'autre cas, l'absence des Whirly augmente le pool d'ADN monocaténaire pouvant envahir un duplex au site d'une microhomologie (**fig. 15B**). De plus l'absence des Whirly et des RECA sur l'ADN simple brin nouvellement résecté suite à un bris double brin risque d'augmenter ce pool d'ADN monocaténaire encore plus. En somme, le blocage de la voie de prévention du MMBIR et de la voie de la RH causerait l'augmentation du nombre d'invasions par microhomologie créant ainsi une grande quantité de réarrangements. Alternativement, les nouvelles boucles d'ADN monocaténaire générées en l'absence de RECA1 pourront être ciblées par l'ADN simple brin non protégé par les Whirly ou réparé par la RH via RECA2. Le modèle de la **Figure 15** condense les deux modèles présentés plus haut et éclaire la synergie entre RECA1 et les Whirly pour générer davantage des invasions par microhomologie. Les modèles que nous avançons proposent une forme d'interaction entre les Whirlies et les protéines RECA (**fig. 15**). Comme nous avons pu le constater avec le triple mutant *recA1-1* x *why1why3*, les réarrangements de type MMBIR explosent en quantité dans ce contexte. Cela serait donc dû d'abord à une diminution du nombre de RECA total disponible pour effectuer la

RH et ensuite à une recombinaison illégitime incontrôlée due à l'absence des protéines Whirly. Notre modèle arrive donc à expliquer nos résultats et suggère un fort rapprochement entre les systèmes de maintien de la stabilité génomique du plastide et de la bactérie.

Importance de l'activité RECA dans les tissus réplicatifs

Nous avons démontré que l'expression de *RECA2* dans le mutant *recA1-1* est augmentée possiblement dans le but de parer à l'absence de *RECA1*. Il a également été démontré que l'expression de *RECA2* est particulièrement forte dans les jeunes plantes, plus spécifiquement dans les tissus hautement réplicatifs (6). Nos résultats suggèrent que la protéine RECA1 pourrait contribuer à la réplication de l'ADN en aidant la réinitiation des fourches de réplication bloquées ou effondrées. L'importance de l'expression des gènes *RECA* dans les tissus réplicatifs contribuerait à expliquer la sensibilité des mutants *recA1-1* et *recA1-2* à la ciprofloxacine, car cet agent cible les gyrases qui agissent probablement en aval de l'appareil réplicatif. La localisation de l'expression de *RECA1* aux tissus réplicatifs expliquerait aussi le phénotype grave du triple mutant *recA1-1* x *why1why3*. En bas âge, les feuilles de ce mutant sont crispées, ridées et souvent variégées aux extrémités (**fig. 9D**). D'ailleurs, comme il fut mentionné, la quantité d'ADN chloroplastique d'*Arabidopsis* diminue avec l'âge de la plante (52) ce qui appuie l'importance des protéines RECA1 et RECA2 à ce stade. Ceci pourrait expliquer pourquoi le triple mutant rattrape son retard de croissance et perd modérément l'intensité de ces phénotypes à l'âge adulte.

RECA1 et RECA2 dans le maintien de la stabilité génomique des tissus sexuels

Le taux de germination du triple mutant est hautement réduit (**fig. 7C**), ce qui suggère que le développement des cellules reproductives mâles et/ou femelles est compromis et que *RECA1* joue un rôle important dans l'oogenèse et/ou dans la spermatogénèse. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que l'expression de *RECA2* est

particulièrement prononcée dans les tissus reproductifs de la plante tels les fleurs, les anthères, le pollen et les ovules (6). Il est aussi intéressant de noter que le double mutant *MSH1 x recA3-1* présente un taux de croissance ralenti, un temps de floraison retardé, une fertilité plus basse, moins de pollen et aussi moins de graines par silique (15). Typiquement, MSH1 agit en tant que protéine réparant les bases d'ADN mal assorties (MMR) (29). Encore une fois, il se pourrait que comme pour *RECA2* la localisation de l'expression de *RECA1* soit significativement plus prononcée dans les tissus sexuels. Ceci expliquerait pourquoi le triple mutant a un faible taux de germination (**fig. 7C**) et à une mortalité élevée chez ces jeunes plantes non stressées (**fig. 7D**).

RECA1 et POLIB dans le maintien de la stabilité génomique des tissus réplicatifs

Chez *Arabidopsis* il existe deux polymérase de l'ADN qui sont ciblées aux organelles, nommées POLIA et POLIB. Alors que les deux protéines ont été impliquées dans la réplication de l'ADN chloroplastique, il a été démontré que POLIB joue un rôle spécifique dans la réparation de l'ADN. La mutation de *POLIB*, comme la mutation de *RECA1*, entraîne une sensibilité à la ciprofloxacine sans pour autant provoquer l'accumulation de plus de produits MMBIR. Il a aussi été rapporté que le triple mutant *pollb-1 x why1why3*, comme le triple mutant *recA1-1 x why1why3*, exhibe un phénotype sévère comparativement à ses parents. En effet, le mutant *pollb-1 x why1why3* présente un retard sévère de croissance et des feuilles pâles indiquant une synergie entre les mutations, car la plante *pollb-1* est identique à la plante sauvage (66). Comme les phénotypes des deux triples mutants se ressemblent, il devient tentant de proposer que *RECA1*, est directement impliqué dans la réplication de l'ADN avec *POLIB*. Le corolaire de cette hypothèse serait que les gènes *POLIB* et *RECA1* sont épistatiques et que la combinaison de leur mutation ne produit aucun phénotype supplémentaire. Au cours de notre étude, nous avons isolé différentes combinaisons de mutations sans pouvoir les tester toutes, dont *pollb-1 X recA1-1*. En accord avec notre hypothèse, cette lignée ne montre aucun phénotype particulier par rapport aux phénotypes des parents. Il sera néanmoins nécessaire de pousser l'étude de ce mutant plus à fond dans le future.

Ces données appuient néanmoins la proposition d'un rôle pour RECA1 dans la réplication de l'ADN probablement grâce à un mécanisme similaire à la RDR.

PERSPECTIVES

La surface a été seulement égratignée en ce qui concerne les voies de réparation légitimes qui assurent la stabilité génomique des organelles de plantes. Une expérimentation plus poussée permettra de caractériser ces mécanismes afin de mieux comprendre la dynamique par laquelle s'opère la réparation de l'ADN par des voies conservatrices telle que celle occupée par les homologues des RecA bactériennes chez *Arabidopsis thaliana*. Les résultats de notre étude ainsi que les résultats récemment publiés nous encouragent d'ailleurs à considérer certaines expériences pour mieux comprendre la ou les voies par lesquelles RECA1 et RECA2 opèrent dans le chloroplaste.

Stratégies pour l'étude de RECA1 et RECA2 dans le chloroplaste

Il serait intéressant dans le futur de comparer par qRT-PCR l'expression de *RECA1* et *RECA2* dans les pousses et les plantes matures. Il serait également utile de comparer l'effet de la ciprofloxacine et du peroxyde d'hydrogène sur l'expression de *RECA1* et *RECA2*. En effet, la ciprofloxacine cause des bris double brin en aval de la fourche de réplication exclusivement dans les organelles (12) tandis que le peroxyde d'hydrogène provoque des mésappariement entre les bases bloquant les fourches répliquatives (77). Nous pourrions ainsi établir la contribution respective de *RECA1* et *RECA2* quant aux phénomènes de la réplication et de la réparation de l'ADN. Pour étudier le patron d'expression du gène *RECA1*, nous pourrions mettre sous contrôle du promoteur de *RECA1* la β -glucuronidase et cloner la construction dans *Arabidopsis*. L'activité de la β -glucuronidase nous permettra alors de déterminer les régions de la plante exprimant *RECA1* en grande quantité.

Les mutants d'insertions du gène *RECA2* sont incapables de produire des racines ainsi que de vraies premières feuilles. De plus leur croissance s'arrête au stade de jeune pousse (6). Ceci explique sans doute pourquoi les mutants *RECA2* ne peuvent qu'être obtenus de parents hétérozygotes pour l'insertion T-DNA et qu'ils sont incapables d'atteindre l'âge adulte. Comme nous l'avons démontré avec le mutant *recA1-1* il semble y avoir complémentarité de *RECA1* par *RECA2* (**fig. 14C**). Afin d'étudier le rôle

commun aux protéines RECA1 et RECA2 dans le maintien de la stabilité génomique du chloroplaste, un double mutant d'insertion aurait été souhaitable, mais étant donné les phénotypes des mutants d'insertions *RECA2* nous estimons qu'un tel double mutant serait létal pour l'embryon. Deux alternatives s'offrent tout de même pour recréer ces conditions c'est-à-dire, l'absence simultanée de RECA1 et RECA2. Une possibilité est d'utiliser un inhibiteur spécifique aux protéines RecA bactériennes pour abolir toute activité des trois protéines RECA d'*Arabidopsis*. Une grande variété d'inhibiteurs de l'activité ATPase de la RecA de *E. coli* vient d'ailleurs d'être développée et ceux-ci pourraient être utilisés pour inhiber les RecA d'*Arabidopsis thaliana* (159). L'avantage d'utiliser un tel inhibiteur est que ceux-ci peuvent être administrés par plusieurs voies aux plantes, mais aussi à plusieurs temps. Un autre avantage serait la possibilité d'étudier l'effet d'une absence des deux protéines RECA ciblées aux organelles; RECA1 et RECA2 au chloroplaste, RECA2 et RECA3 aux mitochondries. Par contre ceci impliquerait aussi qu'on ne pourrait pas avoir sélectivement une seule organelle dénuée de ses RECA respectives. Une alternative aux inhibiteurs des RECA bactérienne serait de transformer *Arabidopsis thaliana* avec un système de miRNA inducible ciblant les transcrits du gène de *RECA2*. Cette lignée transgénique pourrait ensuite être croisée aux mutants d'insertions de *RECA1* et *RECA3*. Ceci permettrait de compromettre les RECA d'une seule organelle. Néanmoins la production d'un mutant miRNA demande beaucoup de temps tout comme l'obtention de double mutant homozygote entre ce mutant miRNA et le mutant d'insertion RECA.

Interaction épistatique entre les RECA, les OSB et POLIB

Chez les procaryotes, le recrutement des protéines RecA à l'ADN monocaténaire se fait avec l'aide de la protéine SSB (single-stranded DNA binding protein) qui lie l'ADN simple brin non spécifiquement avant RecA (69, 72, 74-75). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la réplication et la réparation de l'ADN des bactéries (72, 75). Les protéines SSB sont donc essentielles à l'enclenchement de la réaction de RH *in vivo* (72, 75) où la protéine RecA catalyse l'invasion d'un brin d'ADN monocaténaire dans de l'ADN bicaténaire homologue. Elles sont également directement impliquées dans le recrutement ainsi qu'à l'assemblage du replisome à la fourche réplivative (39, 44-45). Il

a été établi que des protéines SSB existent chez *Arabidopsis thaliana* et elles ont été nommées mtSSB car elles sont ciblées exclusivement à la mitochondrie (46). À ce jour, aucune SSB ciblée au chloroplaste n'a été trouvée. Par contre, il y a dans le soja une protéine ciblée au chloroplaste partageant une grande similarité de séquence avec SSB, mais le rôle de cette protéine semble d'être uniquement d'entreprendre la réplication à l'origine de réplication du chloroplaste (47). Fait intéressant, il existe aussi deux protéines ciblées au chloroplaste liant l'ADN monocaténaire, OSB2 et OSB3. Celles-ci partagent une structure commune avec les protéines de type SSB et pourraient agir dans la voie de la RH au même titre que SSB (62). En l'occurrence, leur homologue ciblé à la mitochondrie, OSB1, semble être impliqué dans la RH (62). Les OSB chloroplastiques pourraient remplir le rôle essentiel des protéines SSB au niveau du chloroplaste. Il serait intéressant afin de pousser l'étude des modèles que l'on propose de croiser les mutants d'insertion OSB2, OSB3, RECA1, RECA2 et POLIB ensemble afin d'établir leurs relations épistatiques. Chez *Arabidopsis* OSB4 n'a pas été caractérisé et donc, l'endroit précis où cette protéine est ciblée n'est pas connu. Il faudrait établir où OSB4 est ciblé afin de tirer des conclusions des doubles et triples mutants entre les OSB, RECA et POLIB.

Le triple mutant *polIb-1 x why1why3* se comporte de la même façon que *recA1-1 x why1why3* en termes d'aggravation du phénotype comparativement au double mutant *why1why3*. Ceci nous indique que *polIb* ne participe pas à la même voie que les Whirly. Au contraire, le double mutant *polIb-1 x recA1-1* présente un phénotype identique aux mutants *polIb-1* et *recA1-1* suggérant une relation épistatique entre *POLIB* et *RECA1*. Il serait donc intéressant de croiser les mutants d'insertion *polIb* avec les mutants des OSB chloroplastiques afin d'établir leurs interactions épistatiques.

Système de bris inductible; outil d'étude pour la caractérisation des mécanismes de réparation dans les organelles de plantes

Afin de solidifier les différents modèles que nous proposons nous avons transformé, dans le cadre de cette maîtrise, une plante pour qu'elle exprime une endonucléase. À cette endonucléase, nommée SwaI (80), fut ajouté un peptide transit ciblant l'enzyme au chloroplaste, un intron et un promoteur régulant son expression de manière à être

inductible au dexaméthasone. SwaI ne peut cliver le génome du chloroplaste qu'à trois sites seulement. Un tel système inductible chez *Arabidopsis* nous aurait permis de valider par CHIP la présence physique de plusieurs protéines autour d'un bris double brin précis dans l'ADN. Ceci aurait grandement solidifié nos modèles, mais ce projet fut temporairement arrêté dû à la publication d'un autre laboratoire ayant produit un mutant semblable chez *Arabidopsis* (81). Après plusieurs semaines d'attente, nous avons obtenu et testé à maintes reprises cet autre mutant exprimant une endonucléase qui s'est avéré non fonctionnel. Ainsi dû à des contraintes de temps notre plante mutante exprimant SwaI fut isolée, mais ne fut pas caractérisée à temps pour être incluse dans ce rapport. Ce mutant inductible pourra tout de même être utilisé par notre laboratoire dans des études futures pour établir quels sont les acteurs présents autour d'un bris double brin dans l'ADN afin de confirmer certains de nos modèles et de nos hypothèses. Par acteur nous parlons des Whirly, RECA, OSB, POLIB ainsi que d'autres protéines impliquées dans des voies de réparation différentes. SwaI cliverait à 11 sites dans le génome de la mitochondrie et serait également un outil à utiliser pour l'étude de la stabilité génomique dans la mitochondrie.

RÉFÉRENCES

1. Edwards, K., C. Johnstone, et al. (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucleic Acids Res **19**(6): 1349.
2. Weigel D., Glazebrook J., et al. (2002) "Arabidopsis: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
3. Alonso J.M., et al. (2003) "Genomewide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* 301:653–657.
4. Sessions, A., E. Burke, et al. (2002). "A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system." Plant Cell **14**(12): 2985-2994.
5. Till BJ, et al. (2003) "Large-scale discovery of induced point mutations with highthroughput TILLING." *Genome Res* 13:524–530.
6. Miller-Messmer, M., K. Kuhn, et al. (2012). "RECA-dependent DNA repair results in increased heteroplasmy of the Arabidopsis mitochondrial genome." Plant Physiol.
7. Cerutti, H., A. M. Johnson, et al. (1995). "Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of Escherichia coli RecA." Mol Cell Biol **15**(6): 3003-3011.
8. Marechal, A., J. S. Parent, et al. (2009). "Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14693-14698.
9. Cappadocia, L., A. Marechal, et al. (2010). "Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair." Plant Cell **22**(6): 1849-1867.
10. Marechal, A. and N. Brisson (2010). "Recombination and the maintenance of plant organelle genome stability." New Phytol **186**(2): 299-317.
11. Hastings, P. J., G. Ira, et al. (2009). "A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation." PLoS Genet **5**(1): e1000327.

12. Wall, M. K., L. A. Mitchenall, et al. (2004). "Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7821-7826.
13. Maxwell, A. (1997) *Trends Microbiol.* **5**, 102–109.
14. Shedge, V., J. Davila, et al. (2010). "Extensive rearrangement of the Arabidopsis mitochondrial genome elicits cellular conditions for thermotolerance." Plant Physiol **152**(4): 1960-1970.
15. Shedge, V., M. Arrieta-Montiel, et al. (2007). "Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs." Plant Cell **19**(4): 1251-1264.
16. Courcelle J., Ganesan A. K., Hanawalt P. C. (2001) "Therefore, what are recombination proteins there for?" BioEssays **23**:463–470.
17. Courcelle, J. and P. C. Hanawalt (2003). "RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks." Annu Rev Genet **37**: 611-646.
18. Salguero, I., E. Guarino, et al. (2011). "RecA-dependent replication in the nrdA101(Ts) mutant of Escherichia coli under restrictive conditions." J Bacteriol **193**(11): 2851-2860.
19. Mosig, G. (1998). "Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4." Annu Rev Genet **32**: 379-413.
20. Kreuzer, K. N., M. Saunders, et al. (1995). "Recombination-dependent DNA replication stimulated by double-strand breaks in bacteriophage T4." J Bacteriol **177**(23): 6844-6853.
21. Woelfle, M. A., R. J. Thompson, et al. (1993). "Roles of novobiocin-sensitive topoisomerases in chloroplast DNA replication in Chlamydomonas reinhardtii." Nucleic Acids Res **21**(18): 4231-4238.
22. Nyberg, K. A., R. J. Michelson, et al. (2002). "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints." Annu Rev Genet **36**: 617-656.
23. Bartek, J., C. Lukas, et al. (2004). "Checking on DNA damage in S phase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 792-804.
24. Toueille, M. and U. Hubscher (2004). "Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability." Chromosoma **113**(3): 113-125.

25. White, M. F. (2011). "Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends." Biochem Soc Trans **39**(1): 15-19.
26. Bendich, A. J. (2004). "Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion." Plant Cell **16**(7): 1661-1666.
27. Backert, S. and T. Borner (2000). "Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.)." Curr Genet **37**(5): 304-314.
28. Manchekar, M., K. Scissum-Gunn, et al. (2006). "DNA recombination activity in soybean mitochondria." J Mol Biol **356**(2): 288-299.
29. Foury, F., J. Hu, et al. (2004). "Mitochondrial DNA mutators." Cell Mol Life Sci **61**(22): 2799-2811.
30. Courcelle, J., D. J. Crowley, et al. (1999). "Recovery of DNA replication in UV-irradiated *Escherichia coli* requires both excision repair and recF protein function." J Bacteriol **181**(3): 916-922.
31. Didier, J. P., R. Villet, et al. (2011). "Impact of ciprofloxacin exposure on *Staphylococcus aureus* genomic alterations linked with emergence of rifampin resistance." Antimicrob Agents Chemother **55**(5): 1946-1952.
32. Krause, K., I. Kilbiński, et al. (2005). "DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles." FEBS Lett **579**(17): 3707-3712.
33. Cerutti, H., M. Osman, et al. (1992). "A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8068-8072.
34. Desveaux, D., C. Despres, et al. (2000). "PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato." Plant Cell **12**(8): 1477-1489.
35. Prikryl, J., K. P. Watkins, et al. (2008). "A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis." Nucleic Acids Res **36**(16): 5152-5165.
36. Kuzminov, A. (2001). "Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8241-8246.

37. Dillingham, M. S. and S. C. Kowalczykowski (2008). "RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks." Microbiol Mol Biol Rev **72**(4): 642-671, Table of Contents.
38. Lusetti, S. L. and M. M. Cox (2002). "The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks." Annu Rev Biochem **71**: 71-100.
39. Cox, M. M. (2007). "Regulation of bacterial RecA protein function." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(1): 41-63.
40. McInerney, P. and M. O'Donnell (2007). "Replisome fate upon encountering a leading strand block and clearance from DNA by recombination proteins." J Biol Chem **282**(35): 25903-25916.
41. Atkinson, J. and P. McGlynn (2009). "Replication fork reversal and the maintenance of genome stability." Nucleic Acids Res **37**(11): 3475-3492.
42. Yeeles, J. T. and M. S. Dillingham (2010). "The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes." DNA Repair (Amst) **9**(3): 276-285.
43. McEntee, K., G. M. Weinstock, et al. (1980). "recA protein-catalyzed strand assimilation: stimulation by Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(2): 857-861.
44. Steffen, S. E. and F. R. Bryant (2001). "Purification and characterization of the single-stranded DNA binding protein from Streptococcus pneumoniae." Arch Biochem Biophys **388**(1): 165-170.
45. Shereda, R. D., A. G. Kozlov, et al. (2008). "SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes." Crit Rev Biochem Mol Biol **43**(5): 289-318.
46. Edmondson, A. C., D. Song, et al. (2005). "Characterization of a mitochondrially targeted single-stranded DNA-binding protein in Arabidopsis thaliana." Mol Genet Genomics **273**(2): 115-122.
47. Lassen, M. G., S. Kochhar, et al. (2011). "Identification of a soybean chloroplast DNA replication origin-binding protein." Plant Mol Biol **76**(3-5): 463-471.

48. Shereda, R. D., N. J. Reiter, et al. (2009). "Identification of the SSB binding site on *E. coli* RecQ reveals a conserved surface for binding SSB's C terminus." J Mol Biol **386**(3): 612-625.
49. Lu, D. and J. L. Keck (2008). "Structural basis of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein stimulation of exonuclease I." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9169-9174.
50. Waterworth, W. M., G. E. Drury, et al. (2011). "Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together." New Phytol **192**(4): 805-822.
51. Wyman, C. and R. Kanaar (2006). "DNA double-strand break repair: all's well that ends well." Annu Rev Genet **40**: 363-383.
52. Rowan, B. A., D. J. Oldenburg, et al. (2010). "RecA maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in *Arabidopsis*." J Exp Bot **61**(10): 2575-2588.
53. Deng, X. W., R. A. Wing, et al. (1989). "The chloroplast genome exists in multimeric forms." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 4156-4160.
54. Backert, S., P. Dorfel, et al. (1996). "Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in the higher plant *Chenopodium album* (L.)." Mol Cell Biol **16**(11): 6285-6294.
55. Backert, S. and T. Borner (2000). "Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.)." Curr Genet **37**(5): 304-314.
56. Oldenburg, D. J. and A. J. Bendich (1996). "Size and Structure of Replicating Mitochondrial DNA in Cultured Tobacco Cells." Plant Cell **8**(3): 447-461.
57. Oldenburg, D. J. and A. J. Bendich (2004). "Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms." J Mol Biol **335**(4): 953-970.
58. Lilly, J. W., M. J. Havey, et al. (2001). "Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants." Plant Cell **13**(2): 245-254.
59. Luder, A. and G. Mosig (1982). "Two alternative mechanisms for initiation of DNA replication forks in bacteriophage T4: priming by RNA polymerase and by recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(4): 1101-1105.

60. Asai, T., D. B. Bates, et al. (1994). "DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli*: dependence on homologous recombination functions." Cell **78**(6): 1051-1061.
61. Skarstad, K. and E. Boye (1993). "Degradation of individual chromosomes in *recA* mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(17): 5505-5509.
62. Zaegel, V., B. Guermann, et al. (2006). "The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in *Arabidopsis*." Plant Cell **18**(12): 3548-3563.
63. Pang, Q., J. B. Hays, et al. (1993). "Selection of *Arabidopsis* cDNAs that partially correct phenotypes of *Escherichia coli* DNA-damage-sensitive mutants and analysis of two plant cDNAs that appear to express UV-specific dark repair activities." Plant Mol Biol **22**(3): 411-426.
64. Pang, Q., J. B. Hays, et al. (1992). "A plant cDNA that partially complements *Escherichia coli recA* mutations predicts a polypeptide not strongly homologous to RecA proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8073-8077.
65. Kolodner, R. D. and K. K. Tewari (1975). "Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism." Nature **256**(5520): 708-711.
66. Parent, J. S., E. Lepage, et al. (2011). "Divergent roles for the two PolII-like organelle DNA polymerases of *Arabidopsis*." Plant Physiol **156**(1): 254-262.
67. Hays, J. B. (2002). "*Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions." DNA Repair (Amst) **1**(8): 579-600.
68. McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2002). "Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG." Trends Genet **18**(8): 413-419.
69. Harmon, F. G. and S. C. Kowalczykowski (1998). "RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination." Genes Dev **12**(8): 1134-1144.
70. Hartung, F., H. Plchova, et al. (2000). "Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **28**(21): 4275-4282.
71. Roy, R., A. G. Kozlov, et al. (2009). "SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation." Nature **461**(7267): 1092-1097.

72. Kowalczykowski, S. C. and R. A. Krupp (1987). "Effects of Escherichia coli SSB protein on the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of Escherichia coli RecA protein. Evidence that SSB protein facilitates the binding of RecA protein to regions of secondary structure within single-stranded DNA." J Mol Biol **193**(1): 97-113.
73. Reddy, M. S., M. B. Vaze, et al. (2000). "Binding of SSB and RecA protein to DNA-containing stem loop structures: SSB ensures the polarity of RecA polymerization on single-stranded DNA." Biochemistry **39**(46): 14250-14262.
74. Anderson, D. G. and S. C. Kowalczykowski (1997). "The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner." Cell **90**(1): 77-86.
75. Dixon, D. A. and S. C. Kowalczykowski (1995). "Role of the Escherichia coli recombination hotspot, chi, in RecABCD-dependent homologous pairing." J Biol Chem **270**(27): 16360-16370.
76. Ivancic-Bace, I., P. Peharec, et al. (2003). "RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient recB mutant of Escherichia coli." Genetics **163**(2): 485-494.
77. Boesch, P., F. Weber-Lotfi, et al. (2011). "DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging." Biochim Biophys Acta **1813**(1): 186-200.
78. Wigle, T. J., J. Z. Sexton, et al. (2009). "Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in Escherichia coli." J Biomol Screen **14**(9): 1092-1101.
79. Sexton, J. Z., T. J. Wigle, et al. (2010). "Novel Inhibitors of E. coli RecA ATPase Activity." Curr Chem Genomics **4**: 34-42.
80. Lechner, M., B. Frey, et al. (1992). "SwaI, a unique restriction endonuclease from Staphylococcus warneri, which recognizes 5'-ATTTAAAT-3'." Nucleic Acids Res **20**(9): 2293-2296.
81. Kwon, T., E. Huq, et al. (2010). "Microhomology-mediated and nonhomologous repair of a double-strand break in the chloroplast genome of Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13954-13959.

82. Sapp, J., Mitochondria and their host: morphology to molecular phylogeny. In: Martin, W. F. and Muller, M. editors. Origin of mitochondria and hydrogenosomes. Heidelberg, Germany, Springer, 2007. pp 57–84.
83. Davidov, Y. and E. Jurkevitch (2009). "Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes." Bioessays **31**(7): 748-757.
84. Gray, M. W. and W. F. Doolittle (1982). "Has the endosymbiont hypothesis been proven?" Microbiol Rev **46**(1): 1-42.
85. Gray, M. W., G. Burger, et al. (1999). "Mitochondrial evolution." Science **283**(5407): 1476-1481.
86. Yoon, H. S., J. D. Hackett, et al. (2004). "A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes." Mol Biol Evol **21**(5): 809-818.
87. Douzery, E. J., E. A. Snell, et al. (2004). "The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?" Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15386-15391.
88. Chan, C. X., J. Gross, et al. (2011). "Plastid origin and evolution: new models provide insights into old problems." Plant Physiol **155**(4): 1552-1560.
89. Bhattacharya D, Medlin L. (1995) The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. J Phycol **31**: 489–498.
90. Delwiche, C. F., M. Kuhsel, et al. (1995). "Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids." Mol Phylogenet Evol **4**(2): 110-128.
91. McFadden, G. I. (2001). "Chloroplast origin and integration." Plant Physiol **125**(1): 50-53.
92. Bhattacharya, D., H. S. Yoon, et al. (2004). "Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots." Bioessays **26**(1): 50-60.
93. Richly, E. and D. Leister (2004). "NUPTs in sequenced eukaryotes and their genomic organization in relation to NUMTs." Mol Biol Evol **21**(10): 1972-1980.
94. Richly, E. and D. Leister (2004). "NUMTs in sequenced eukaryotic genomes." Mol Biol Evol **21**(6): 1081-1084.

95. Martin, W., T. Rujan, et al. (2002). "Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12246-12251.
96. Richly, E. and D. Leister (2004). "An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice." Gene **329**: 11-16.
97. Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis, et al. (2008). "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." Science **319**(5868): 1352-1355.
98. Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez (2008). "Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences." Nat Rev Genet **9**(3): 204-217.
99. Bock R. (2007) Structure, function and inheritance of plastid genomes. In: Bock R, ed. Cell and molecular biology of plastids. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 29–63.
100. O'Brien, E. A., Y. Zhang, et al. (2009). "GOBASE: an organelle genome database." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D946-950.
101. Abdelnoor, R. V., R. Yule, et al. (2003). "Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5968-5973.
102. Marechal, A., J. S. Parent, et al. (2008). "Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function." BMC Plant Biol **8**: 42.
103. Gutman, B. L. and K. K. Niyogi (2009). "Evidence for base excision repair of oxidative DNA damage in chloroplasts of Arabidopsis thaliana." J Biol Chem **284**(25): 17006-17012.
104. Boesch, P., N. Ibrahim, et al. (2009). "Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway." Nucleic Acids Res **37**(17): 5690-5700.
105. Boesch, P., F. Weber-Lotfi, et al. (2011). "DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging." Biochim Biophys Acta **1813**(1): 186-200.

106. Nielsen, B. L., J. D. Cupp, et al. (2010). "Mechanisms for maintenance, replication, and repair of the chloroplast genome in plants." J Exp Bot **61**(10): 2535-2537.
107. Chase, C. D. (2007). "Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions." Trends Genet **23**(2): 81-90.
108. Dewey, R. E., D. H. Timothy, et al. (1987). "A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5374-5378.
109. Feng, X., A. P. Kaur, et al. (2009). "Substoichiometric shifting in the fertility reversion of cytoplasmic male sterile pearl millet." Theor Appl Genet **118**(7): 1361-1370.
110. Kass, E. M. and M. Jasin (2010). "Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways." FEBS Lett **584**(17): 3703-3708.
111. Haber, J. E. (1999). "DNA recombination: the replication connection." Trends Biochem Sci **24**(7): 271-275.
112. Maher, R. L., A. M. Branagan, et al. (2011). "Coordination of DNA replication and recombination activities in the maintenance of genome stability." J Cell Biochem **112**(10): 2672-2682.
113. McVey, M. and S. E. Lee (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." Trends Genet **24**(11): 529-538.
114. Livneh, Z., O. Ziv, et al. (2010). "Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis." Cell Cycle **9**(4): 729-735.
115. Nasmyth, K. A. (1982). "Molecular genetics of yeast mating type." Annu Rev Genet **16**: 439-500.
116. Thaler, D. S. and F. W. Stahl (1988). "DNA double-chain breaks in recombination of phage lambda and of yeast." Annu Rev Genet **22**: 169-197.
117. Llorente, B., C. E. Smith, et al. (2008). "Break-induced replication: what is it and what is it for?" Cell Cycle **7**(7): 859-864.

118. Lovett, S. T., R. L. Hurley, et al. (2002). "Crossing over between regions of limited homology in *Escherichia coli*. RecA-dependent and RecA-independent pathways." Genetics **160**(3): 851-859.
119. VanHulle, K., F. J. Lemoine, et al. (2007). "Inverted DNA repeats channel repair of distant double-strand breaks into chromatid fusions and chromosomal rearrangements." Mol Cell Biol **27**(7): 2601-2614.
120. Davis, A. P. and L. S. Symington (2004). "RAD51-dependent break-induced replication in yeast." Mol Cell Biol **24**(6): 2344-2351.
121. Sandhu, A. P., R. V. Abdelnoor, et al. (2007). "Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1766-1770.
122. Mikami, T. (1992). "[Molecular basis of cytoplasmic male sterility in higher plants]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **37**(7): 1130-1136.
123. Cox, M. M., M. F. Goodman, et al. (2000). "The importance of repairing stalled replication forks." Nature **404**(6773): 37-41.
124. Kuzminov, A. (2001). "Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8241-8246.
125. Liu, B. and B. M. Alberts (1995). "Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex." Science **267**(5201): 1131-1137.
126. McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2002). "Recombinational repair and restart of damaged replication forks." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(11): 859-870.
127. Heller, R. C. and K. J. Marians (2006). "Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand." Nature **439**(7076): 557-562.
128. Bendich, A. J. (2004). "Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion." Plant Cell **16**(7): 1661-1666.
129. Arabidopsis Protocols, 2nd Edition (Methods in Molecular Biology) (2006) Julio Salinas, José J. Sánchez-Serrano.
130. Zerges, W. (2000). "Translation in chloroplasts." Biochimie **82**(6-7): 583-601.
131. Desveaux, D., A. Marechal, et al. (2005). "Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond." Trends Plant Sci **10**(2): 95-102.

132. Grabowski, E., Y. Miao, et al. (2008). "Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell." Plant Physiol **147**(4): 1800-1804.
133. Desveaux, D., J. Allard, et al. (2002). "A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface." Nat Struct Biol **9**(7): 512-517.
134. Desveaux, D., R. Subramaniam, et al. (2004). "A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis." Dev Cell **6**(2): 229-240.
135. Xiong, J. Y., C. X. Lai, et al. (2009). "Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression." Plant Mol Biol **71**(4-5): 437-449.
136. Yoo, H. H., C. Kwon, et al. (2007). "Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis." Plant J **49**(3): 442-451.
137. Cannistraro, V. J. and J. S. Taylor (2007). "Ability of polymerase eta and T7 DNA polymerase to bypass bulge structures." J Biol Chem **282**(15): 11188-11196.
138. Andre, C., A. Levy, et al. (1992). "Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes." Trends Genet **8**(4): 128-132.
139. Small, I., R. Suffolk, et al. (1989). "Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates." Cell **58**(1): 69-76.
140. Odahara, M., H. Kuroiwa, et al. (2009). "Suppression of repeat-mediated gross mitochondrial genome rearrangements by RecA in the moss *Physcomitrella patens*." Plant Cell **21**(4): 1182-1194.
141. Khazi, F. R., A. C. Edmondson, et al. (2003). "An Arabidopsis homologue of bacterial RecA that complements an E. coli recA deletion is targeted to plant mitochondria." Mol Genet Genomics **269**(4): 454-463.
142. Makovets, S., L. M. Powell, et al. (2004). "Is modification sufficient to protect a bacterial chromosome from a resident restriction endonuclease?" Mol Microbiol **51**(1): 135-147.

143. Amundsen, S. K. and G. R. Smith (2003). "Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery." Cell **112**(6): 741-744.
144. Ivancic-Bace, I., P. Peharec, et al. (2003). "RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient recB mutant of *Escherichia coli*." Genetics **163**(2): 485-494.
145. Ivancic-Bace, I., E. Salaj-Smic, et al. (2005). "Effects of recJ, recQ, and recFOR mutations on recombination in nuclease-deficient recB recD double mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(4): 1350-1356.
146. Bianco, P. R., and S. C. Kowalczykowski. 23 September 2005, posting date. RecA protein. In *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. <http://www.els.net>.
147. Galletto, R., and S. C. Kowalczykowski. 2007. RecA. *Curr. Biol.* **17**:R395–R397.
148. Kowalczykowski, S. C. (2000). "Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication." Trends Biochem Sci **25**(4): 156-165.
149. Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder, and W. M. Rehrauer. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**:401–465.
150. Bell, C. E. (2005). "Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase." Mol Microbiol **58**(2): 358-366.
151. Bianco, P. R., R. B. Tracy, et al. (1998). "DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison." Front Biosci **3**: D570-603.
152. Ahmad, A., E. O. Pereira, et al. (2010). "Green Biofactories: Recombinant Protein Production in Plants." Recent Pat Biotechnol.
153. Maliga, P. and R. Bock (2011). "Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century." Plant Physiol **155**(4): 1501-1510.
154. Sanyal, G. and P. Doig (2012). "Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery." Expert Opin Drug Discov **7**(4): 327-339.
155. Peled-Zehavi H, Danon A (2007) Translation and translational regulation in chloroplasts. In Bock R, ed, *Cell and Molecular Biology of Plastids*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 249–281

156. Barkan, A. (2011). "Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold." Plant Physiol **155**(4): 1520-1532.
157. Timmis, J. N., M. A. Ayliffe, et al. (2004). "Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes." Nat Rev Genet **5**(2): 123-135.
158. Shi, L. X. and S. M. Theg (2011). "The motors of protein import into chloroplasts." Plant Signal Behav **6**(9): 1397-1401.
159. Sexton, J. Z., T. J. Wigle, et al. (2010). "Novel Inhibitors of E. coli RecA ATPase Activity." Curr Chem Genomics **4**: 34-42.

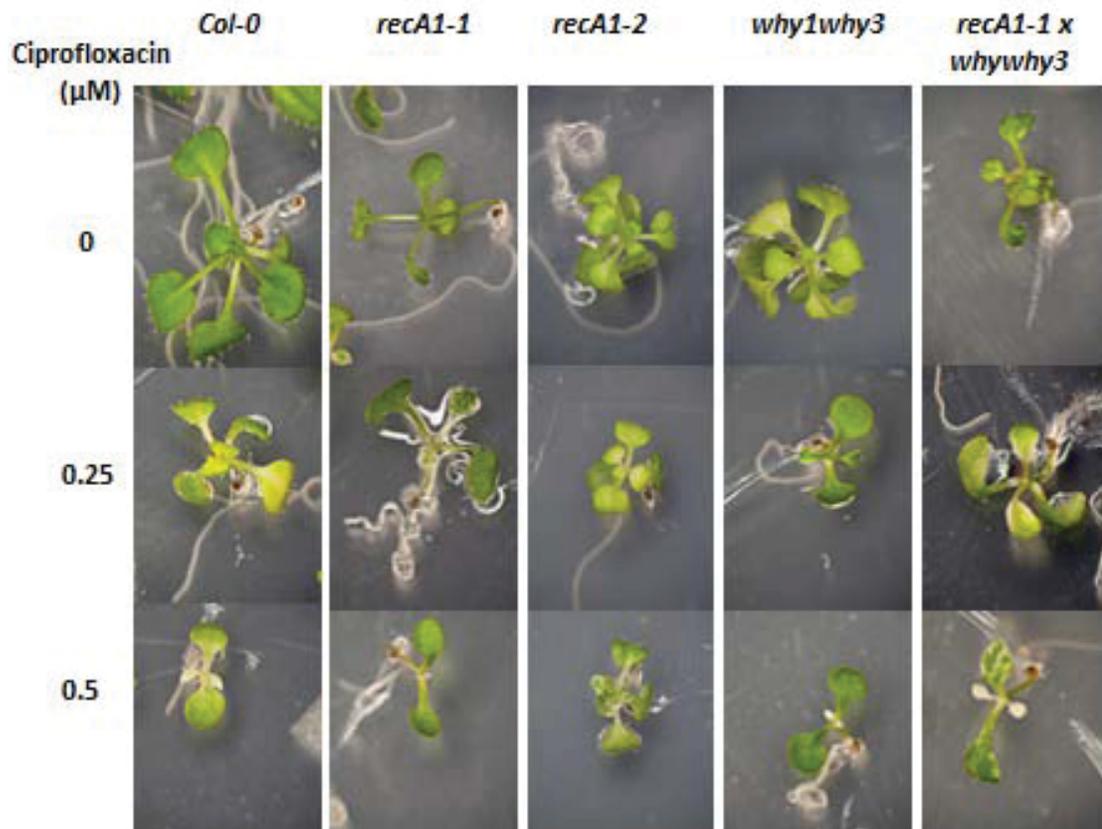


Figure Supplémentaire 2 Photographies des lignées *recA1-1*, *recA1-2*, *why1why3* et *recA1-1 x why1why3* à l'âge de 3 semaines après culture sur milieu stérile MS en présence de concentrations croissantes de ciprofloxacine.

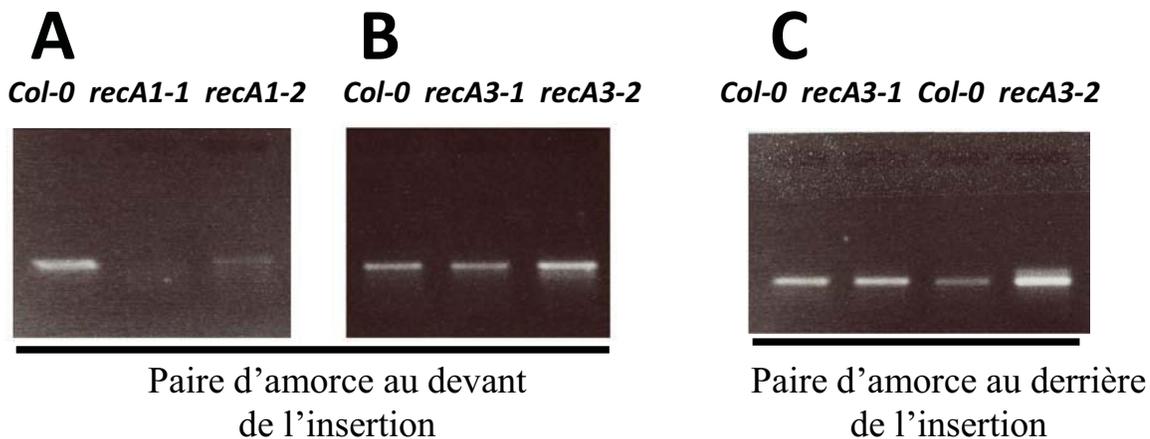


Figure Supplémentaire 3. PCR semi quantitative de l'expression des gènes *RECA1* et *RECA3*. **A.** PCR semi quantitative mesurant l'expression du gène *RECA1* des mutants *recA1-1* et *recA1-2* en comparaison à la plante sauvage *Col-0*. La paire d'amorces utilisée est située devant les insertions des 2 mutants. **B.** PCR semi quantitative mesurant l'expression du gène *RECA3* des mutants *recA3-1* et *recA3-2* en comparaison à la plante sauvage *Col-0*. La paire d'amorce utilisée est située devant les insertions des 2 mutants. **C.** PCR semi quantitative mesurant l'expression du gène *RECA3* des mutants *recA3-1* et *recA3-2* en comparaison à la plante sauvage *Col-0*. La paire d'amorce utilisée est située derrière les insertions des 2 mutants.