

ERIC BOUCHARD

**CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE ET  
CYTOGÉNÉTIQUE DE DEUX LIGNÉES  
D'*ARABIDOPSIS THALIANA* DÉFICIENTES POUR  
PMS1, UNE PROTÉINE DU SYSTÈME DE  
CORRECTION DES MÉSAPPARIEMENTS.**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie végétale  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

Département de phytologie  
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

JUIN 2006

## Résumé

Le système de correction des mésappariements (MMR) des eucaryotes est responsable de la correction des erreurs de réplication de l'ADN et intervient dans la recombinaison méiotique. *AtPMS1*, un gène du MMR chez *Arabidopsis thaliana*, est impliqué dans la correction des mésappariements, mais son rôle méiotique n'a pas encore été déterminé. Nous avons caractérisé deux lignées mutantes pour le gène *AtPMS1*. Une lignée présente une morphologie florale aberrante qui est probablement indépendante de l'inactivation d'*AtPMS1* mais serait plutôt attribuable à un phénomène de cosuppression. La seconde lignée présente plusieurs phénotypes vraisemblablement causés par l'inactivation d'*AtPMS1* : une baisse de fécondité de 65 à 80 %, une ségrégation biaisée de l'allèle mutant et des anomalies cytogénétiques chez 16 % des microsporocytes (fragmentation et ségrégation anormale des chromosomes). Le biais de ségrégation n'a encore jamais été observé chez les autres eucaryotes et semble particulier aux homologues de MutL chez *A. thaliana* ou chez les plantes.

## Abstract

The eukaryotic DNA mismatch repair system (MMR) is responsible for the repair of replication errors, and plays a role in genetic recombination. *AtPMS1*, a MMR gene from *Arabidopsis thaliana*, has already been shown to play a role in DNA repair but its involvement in meiosis has yet to be examined. We characterised two lines of insertional mutants at *AtPMS1*. A first mutant line has abnormal flowers, which is probably a phenotype unrelated to the loss of AtPMS1 activity but rather caused by cosuppression. The second mutant line shows many phenotypes, likely linked to AtPMS1 inactivation: a 65 to 80% reduction in seed production, an abnormal segregation of the mutant allele and cytogenetic abnormalities in 16% of the microsporocytes (chromosome fragmentation and missegregation). The observed bias in segregation as not been observed in other eukaryotes, and seems to be a particularity of *MutL* homologues in *Arabidopsis* or plants as a whole.

## Remerciements

Je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont beaucoup aidé à trouver le courage et la volonté pour finir ce mémoire avec leurs questions, leurs encouragements... et leurs taquineries. D'abord mes parents Louise Frigon et Gilles Bouchard : beaucoup de ce que je suis devenu dépend de vous. Je suis très fier de vous avoir comme parents et je m'en trouve chanceux. Je ne vous le dis pas assez. Mes frères et ma soeur : Mario, Jasmin (et sa conjointe Marlène) et Sophie (et son mari Patrick) pour pleins de choses, les discussions, les encouragements, les modèles et tout le reste. À mes amis Marc et Josée, Eric et Manon (ça y est, j'ai fini, on va pouvoir s'y remettre ! Je tiens beaucoup à vous !). À Francis et la gang des lundis et mercredis soirs (pour le rêve et la compréhension). À la gang du judo de Sherbrooke qui m'a permis de garder ma santé physique et mentale. À la horde des laboratoires de Québec et de Sherbrooke : Martine, Eric, Mélanie, Vicky, Aïda, Alou, Thung, Maxime et tous les autres de l'équipe du Dr Belzile pour m'avoir accueilli et aidé de bien des façons, l'équipe de l'herbier pour le coup de pouce, Marc (encore !), Nathalie et Isabelle (la bière va être bonne), Kada, Mélissa, Marie-Ève, Marie-Chantale, Sylvie, Ju et tous les autres des laboratoires de recherche et de clinique du CHUS pour la répétition sur tous les tons du fameux 'Pis, ton mémoire ?!?', pour les discussions et pour l'amitié.

Un merci particulier à tous mes pré-lecteurs : ma soeur Sophie Bouchard, ma presque soeur Nathalie Bastien et l'inimitable Dr Kada Krabchi. Vous avez relevé la qualité de ce mémoire grâce à votre aide et à vos conseils. Et oui Nathalie, tu avais raison simonac !!!

Merci à l'équipe de Vilmorin qui m'a accueilli lors de mon stage et qui m'a beaucoup apporté.

Un merci tout spécial au Dr François Belzile. Je n'aurais pas pu espérer trouver un meilleur directeur de maîtrise. Je ne trouve pas les mots pour vous dire à quel point votre exemple comme chercheur, professeur et directeur m'a impressionné et inspiré. François, merci pour tout. Et encore merci pour les efforts rapides pour les corrections.

*À tous ceux qui ont poussé sur ce mémoire.*

# Table des matières

INTRODUCTION .....	1
Réplication de l'ADN, polymérase et lecture d'épreuve .....	3
Les systèmes de réparation de l'ADN .....	4
Le système d'excision de base (BER) .....	5
Le système de réparation par excision de nucléotide (NER) .....	5
Réparation des cassures doubles brin par recombinaison .....	5
Le système de correction des mésappariements par excision d'un long fragment d'ADN (MMR) .....	7
Le système MMR chez <i>E. coli</i> .....	7
Le système MMR des eucaryotes .....	9
Le système MMR chez <i>A. thaliana</i> .....	14
La méiose .....	17
La prophase méiotique : appariement, synapse, recombinaison et chiasmas .....	18
Les divisions méiotiques .....	19
Mécanismes moléculaires de la recombinaison méiotique .....	20
Fonction des homologues de MutS et de MutL dans la recombinaison .....	22
Implication du système MMR à la méiose .....	23
Implication de PMS1 dans la méiose et la recombinaison .....	24
<i>Arabidopsis thaliana</i> comme plante modèle .....	24
Méiose, sporogénèse et gamétogénèse .....	25
OBJECTIFS DE LA RECHERCHE .....	27
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	28
Matériel végétal .....	28
Conditions de culture en sol et de propagation des plantes .....	28
Génotypage .....	29
Évaluation de la fécondité des lignées .....	29
Ségrégation des allèles .....	30
Analyse cytogénétique de la méiose .....	30
RÉSULTATS .....	31
Caractérisation de la lignée 4706 .....	33
Morphologie des plants .....	33
Fécondité .....	34
Ségrégation des allèles .....	35
Résumé de la caractérisation de la lignée 4706 .....	35
Caractérisation de la lignée 5368 .....	36
Morphologie des plants .....	36
Fécondité .....	36
Ségrégation des allèles .....	37
Résumé de la caractérisation de la lignée 5368 .....	37
Méiose des microsporocytes de la lignée 5368 .....	37
Déroulement normal de la méiose chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
Anomalies de la méiose chez les microsporocytes de la lignée 5368 .....	44
DISCUSSION .....	49

Phénotype de la lignée 4706 : un cas de cosuppression .....	49
Phénotype de la lignée 5368 .....	51
Fertilité résiduelle : comparaison avec <i>S. cerevisiae</i> et <i>M. musculus</i> , effet méiotique ou mitotique ? .....	51
Ségrégation défavorisant l'allèle mutant : particularité des homologues de MutL d' <i>A. thaliana</i> .....	53
Cytogénétique de la méiose de la lignée 5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i> .....	54
Comparaison cytogénétique entre <i>AtPMS1::T-DNA</i> et <i>Mmpms2</i> .....	58
Hypothèses sur la fonction méiotique d' <i>AtPMS1</i> .....	59
Synthèse sur la lignée <i>AtPMS1::T-DNA</i> 5368 .....	60
BIBLIOGRAPHIE .....	63
Ressources internet .....	70

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Diversité des homologues de MutS et MutL chez les eucaryotes. ....	10
Tableau 2 : Résumé des homologues de MutS et MutL chez les mammifères. ....	11
Tableau 3 : Résumé des homologues de MutS et MutL chez <i>A. thaliana</i> . ....	15
Tableau 4 : Marqueurs cytogénétiques, cytologiques et moléculaires choisis des étapes de la prophase méiotique. Adapté de Roeder 1997. ....	17
Tableau 5 : Fécondité de la lignée 4706. ....	35
Tableau 6 : Fertilité de la lignée 5368. ....	36
Tableau 7 : Résumé des observations cytogénétiques chez <i>A. thaliana</i> de type sauvage WS. .....	44
Tableau 8 : Résumé des observations cytogénétiques chez la lignée 5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i> . .....	45
Tableau 9 : Distribution des anomalies cytogénétiques observées. ....	46
Tableau 10 : Observations cytogénétiques de la lignée 5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i> : données retenues et données incluant les méioses écartées à cause de décompte incertain de chromosomes. ....	71
Tableau 11 : Calculs de fréquence des allèles dans les gamétophytes en ségrégation. ....	72



## Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la synthèse de l'ADN sur le brin meneur et sur le brin retardataire. ....	3
Figure 2 : Schéma de la réparation des DSB par recombinaison homologue (DSBR). ....	6
Figure 3 : Représentation des chromosomes en prophase méiotique. ....	18
Figure 4 : Représentation des étapes de la première division de la méiose. ....	19
Figure 5 : Représentation des étapes de la seconde division de la méiose. ....	20
Figure 6 : Représentation schématique du gène <i>AtPMS1</i> et de la position des insertions du T-DNA chez les deux lignées étudiées. Selon E. Dion, Université Laval. ....	31
Figure 7 : Génotypage des lignées. ....	32
Figure 8 : Morphologies anormales des fleurs de la ligné 4706. ....	34
Figure 9 : Déroulement normal de la méiose chez <i>A. thaliana</i> : stades prophase I à anaphase I. ....	42
Figure 10 : Déroulement normal de la méiose chez <i>A. thaliana</i> : stades prophase II à tétrade. ....	43
Figure 11 : Figures méiotiques anormales observées chez des plants de la lignée mutante 5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i> : stades anaphase II à tétrade. ....	46
Figure 12 : Figures méiotiques anormales observées chez des plants de la lignée mutante 5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i> : stades prophase I à prophase II. ....	47

## Liste des symboles et des abréviations

°C	degré Celcius
$\alpha$ =	niveau de signification du test statistique, probabilité de rejeter une hypothèse qui est vraie
$\mu\text{g}$	microgramme
$\chi^2$ =	test statistique de comparaison de deux distributions
<i>A. thaliana</i>	la plante <i>Arabidopsis thaliana</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire correspondant à un ARNm
ADNg	ADN génomique
ADP	adénosine diphosphate
AE	élément axial, une composante protéique des chromosomes au début de la prophase méiotique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
At	code de deux lettres pour désigner la plante <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	enzyme qui peut lier et hydrolyser l'ATP
BER	réparation par excision de base, de l'anglais «Base Excision Repair».
pb/bp	paire de base / «base pair»
<i>C. elegans</i>	le vers <i>Caenorhabditis elegans</i>
CE	élément central, une composante protéique du complexe synaptonémal
cm	centimètre
<i>D. melanogaster</i>	l'insecte <i>Drosophila melanogaster</i> (mouche à fruit)
DAPI	diamidino phényl indole, fluorochrome qui émet une lumière bleue quand il est lié à l'ADN bicaténaire
DHJ	double jonction de Holliday, intermédiaire moléculaire de la recombinaison homologue et de la recombinaison méiotique
DSB	cassure sur les deux brins d'ADN, de l'anglais «Double Strand Break»
DSBR	réparation des cassures bicaténaires par recombinaison homologue, de l'anglais«Double Strand Break Repair»
<i>E. coli</i>	la bactérie <i>Escherichia coli</i>
ERN	nodules de recombinaison précoces, pour «Early Recombination Nodule»
GGNER	voie du NER globale du génome
Hs	code de deux lettres pour désigner l'humain ( <i>Homo sapiens</i> )
IDL	boucle d'insertion/délétion, pour «Insertion/Deletion Loop»
kb	kilo paires de base = 1 000 pb
kDa	kilo dalton
LE	élément latéral, une composante protéique du complexe synaptonémal
LRN	Nodules de recombinaison tardifs, pour «Late Recombination Nodule»
Mb	méga paires de base = 1 000 000 pb
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre

Mm	code de deux lettres pour désigner la souris ( <i>Mus musculus</i> )
MMR	correction des mésappariements de l'ADN, de l'anglais de «DNA Mismatch Repair»
NCBI	National Center for Biological Information
NER	réparation par excision de nucléotides, de l'anglais «Nucleotide Excision Repair»
-OH ou OH	groupement hydroxyle (alcool)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
pH	mesure de l'acidité = $-\log(\text{concentration H}^+)$
PMS	ségrégation post-méiotique, de l'anglais «Post Meiotic Segregation»
PPD	para phénylène diamine, anti-oxydant
RNase	enzyme qui coupe ou dégrade l'ARN
<i>S. cerevisiae</i>	la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sc	code de deux lettres pour désigner la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	complexe synaptonémal responsable de la synapse à la méiose
sec	seconde
TAIR	The Arabidopsis International Resource
TCNER	voie du NER liée à la transcription
T-DNA	fragment d'ADN inséré dans le génome de l'hôte lors de l'infection par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TE	élément transverse, une composante protéique du SC.
W	watt
WS	écotype Wassilewskija d' <i>Arabidopsis thaliana</i>

# INTRODUCTION

La transmission correcte de l'information génétique d'une génération à l'autre nécessite une réplication fidèle de l'ADN. De plus, l'intégrité de la molécule d'ADN doit être assurée tout au long de la vie de la cellule, malgré les attaques de nombreux agents génotoxiques aussi bien exogènes qu'endogènes. Pour faire face à ces défis, les organismes vivants ont développé plusieurs mécanismes de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN. Ces mécanismes sont aussi variés que les types de dommages auxquels ils doivent faire face. Ainsi, le système de réparation par excision de bases (BER) et le système d'excision des nucléotides (NER) traitent les dommages chimiques, les systèmes de recombinaison homologue et non-homologue traitent les cassures bicaténares (double brin) alors que les systèmes de correction des mésappariements traitent les mésappariements de bases. De plus, le système de lecture d'épreuve de certaines ADN polymérases améliore la fidélité de la réplication de l'ADN.

En plus de ces efforts plus ou moins constants chez toutes les cellules vivantes, un autre défi de taille se pose aux organismes faisant appel à la reproduction sexuée : la recombinaison génétique. Lors de cette recombinaison, essentielle à la formation des gamètes, un brassage des allèles s'effectue entre les chromosomes homologues et permet ainsi l'émergence rapide de nouvelles combinaisons de caractères génétiques chez la descendance. La recombinaison génétique fait appel à certaines protéines participant à différents systèmes de réparation de l'ADN et à d'autres protéines spécialisées. D'autres protéines participent à des mécanismes de blocage visant à empêcher des échanges «illégitimes» entre des séquences non-homologues ou entre des séquences possédant une homologie imparfaite (séquences homéologues). Certains de ces mécanismes de blocage sont attribuables au système de correction des mésappariements.

La recombinaison est d'un intérêt très particulier pour le développement d'espèces et de variétés végétales par les humains. En effet, une part importante du développement et de l'amélioration des espèces végétales d'intérêt agricole se fait par le biais de

croisements entre cultivars différents (ou entre espèces différentes) suivi par une sélection des descendants montrant des caractéristiques intéressantes. Le brassage entre les deux génomes mis en contact lors du croisement se fait par le biais de la recombinaison génétique à la méiose. Si le taux de recombinaison est élevé, le brassage génétique sera considérable et les probabilités d'obtenir une nouvelle combinaison de caractéristiques seront donc plus importantes. À l'inverse, si le taux de recombinaison est faible, le brassage génétique sera minime de même que la probabilité d'obtenir une nouvelle combinaison de caractères. Malheureusement, une baisse importante du taux de recombinaison génétique (jusqu'à trois ordres de grandeur) est observée lorsqu'il y a une divergence entre les séquences d'ADN (Datta *et al.* 1997, Luo *et al.* 2000). Ce phénomène est particulièrement important dans le contexte de croisements interspécifiques chez les plantes. Il arrive souvent que l'on veuille aller puiser chez une espèce voisine un gène conférant un intérêt agronomique (résistance à un stress biotique ou abiotique). Malheureusement, la divergence qui existe entre les séquences d'ADN de ces deux espèces aura pour conséquence de réduire la fréquence de recombinaison entre les deux espèces. Une telle réduction rendra donc plus difficile l'obtention de la lignée chez laquelle le gène d'intérêt aura été introduit chez l'espèce cultivée.

Ce mémoire porte sur le système de correction des mésappariements avec excision d'un long fragment d'ADN («long patch DNA mismatch repair» ou MMR) et plus particulièrement sur certaines fonctions méiotiques d'AtPMS1, une protéine du système MMR chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Pour bien mettre en contexte le rôle et l'importance du MMR dans le maintien de l'intégrité génétique, nous ferons d'abord un bref survol des principaux mécanismes de réparation de l'ADN. Un intérêt particulier sera porté à la réparation des cassures bicaténares par recombinaison homologue étant donné l'implication de ce système de réparation lors de la recombinaison génétique. Nous ferons ensuite une description détaillée du MMR, puis différents aspects de la méiose et de la recombinaison génétique seront décrits. Finalement, quelques particularités d'*Arabidopsis thaliana* en liens avec nos expériences seront décrites.

## Réplication de l'ADN, polymérase et lecture d'épreuve

L'ADN est répliqué par le complexe de réplication (aussi appelé réplisome). Le complexe de réplication s'organise sur l'ADN après la formation d'une section d'ADN simple brin par le complexe d'initiation. Chez les eucaryotes, le complexe de réplication contient entre autres une hélicase qui sépare les deux brins d'ADN, RP-A (ou RPA) qui lie et stabilise l'ADN simple brin, le facteur de processivité PCNA, l'ADN polymérase  $\alpha$  qui initie l'élongation de l'ADN naissant, l'ADN polymérase  $\delta$  qui catalyse l'élongation processive de l'ADN et RF-C qui favorise probablement l'échange entre les ADN polymérases  $\alpha$  et  $\delta$  (Shevelev et Hübscher 2002).

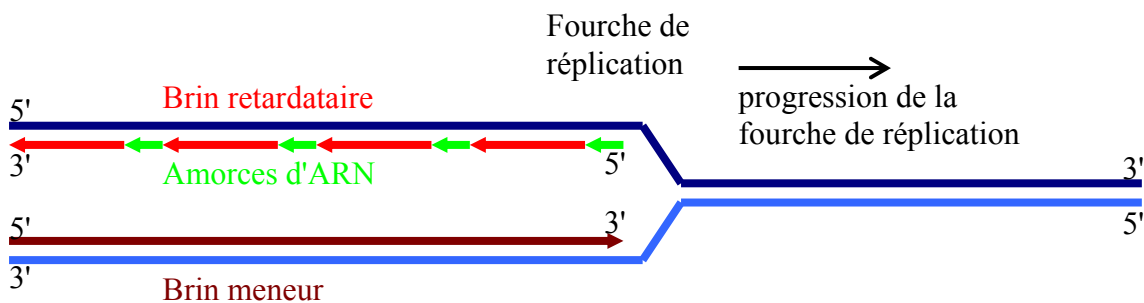


Figure 1 : Schéma de la synthèse de l'ADN sur le brin meneur et sur le brin retardataire.

Les enzymes responsables de la synthèse de la nouvelle molécule d'ADN sont les ADN polymérases. Toutes les ADN polymérases connues ajoutent des désoxyribonucléotides sur une extrémité d'ADN ou d'ARN 3'OH. Cette fonction catalytique résulte en une élongation d'une molécule d'ADN dans le sens 5' vers 3' (5'-3') qui doit se faire à partir d'une molécule d'ADN existante (ou en utilisant un fragment d'ARN comme amorce) et qui nécessite la présence d'un ADN complémentaire utilisé comme gabarit. À cause de la spécificité d'élongation 5'-3', les deux brins de l'ADN ne sont pas synthétisés selon le même processus (voir figure 1). Sur le brin meneur («leading strand»), la synthèse est continue et dans la même direction que la progression de la fourche de réplication. Sur le brin retardataire («lagging strand») la synthèse est discontinue et elle se produit dans la direction opposée de la progression de la fourche de réplication. Ce mode de synthèse nécessite un amorçage répété de la polymérase par des fragments d'ARN sur le brin retardataire. Ces fragments d'ARN sont ensuite dégradés, les discontinuités sont comblées par une ADN polymérase,

puis une ligase rétablit l'intégrité de la molécule d'ADN. Les fragments d'ADN temporairement produits sur le brin retardataire sont appelés fragments d'Okazaki. La fidélité des polymérases responsables de la réplication de l'ADN est très élevée, mais un certain nombre d'erreurs de réplication se produit malgré tout (entre  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$  par pb).

La lecture d'épreuve («proofreading») est le premier mécanisme de correction des erreurs d'incorporation lors de la réplication. Ce système permet l'enlèvement immédiat d'un nucléotide incorrectement incorporé par l'activité d'une exonucléase 3'-5'. Cette activité exonucléotidique peut être associée directement avec une ADN polymérase ( $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ) ou provenir d'une autre protéine (Shevelev et Hübscher 2002). Le phénomène de lecture d'épreuve permet de diminuer le taux d'erreur d'environ 10 à 100 fois. L'ajout des systèmes de réparation de l'ADN permet de diminuer les taux de mutations spontanées à  $10^{-10}$  -  $12^{-12}$  par pb (Kunkel et Bebenek 2000).

## **Les systèmes de réparation de l'ADN**

Toutes les cellules ont constamment à faire face à une multitude d'agressions physiques et chimiques pouvant mener à une altération de leur matériel génétique. Ces agents génotoxiques proviennent de l'environnement (rayonnements ultraviolet et gamma, produits chimiques) ou de l'intérieur même de la cellule (oxygène réactif, sous-produits du métabolisme). Les organismes vivants ont donc développé des voies de réparation pour les dommages à l'ADN. Les types de dommages les plus couramment rencontrés incluent des modifications chimiques de l'ADN, des cassures de la chaîne d'ADN et l'appariement de deux nucléotides non complémentaires. Les principales voies de réparation de ces dommages (Reed 2005) sont les systèmes NER et BER pour enlever les bases chimiquement endommagées, les systèmes de recombinaison pour réparer les cassures double brin et les systèmes BER et de correction des mésappariement pour l'enlèvement des bases incorrectement appariées.

### **Le système d'excision de base (BER)**

Dans le système BER, des glycosylases spécifiques enlèvent de l'ADN certaines bases azotées endommagées (Marti *et al.* 2002). Ces sites apuriques/apyrimidiques sont excisés, puis l'intervalle simple brin de 1 à 8 nucléotides est comblé par une ADN polymérase. Ce système répare principalement les aduits de petite taille (alkylation, oxydation et désamination) et quelques mésappariements pouvant provenir de dommages chimiques ou de l'incorporation erronée d'uracile dans l'ADN (U/G, T/G et peut-être C/C).

### **Le système de réparation par excision de nucléotide (NER)**

Le système NER (Costa *et al.* 2003, Reed 2005) est un système de réparation de l'ADN très versatile : il répare une grande variété de lésions qui déforment la double hélice d'ADN, qui interfèrent avec l'appariement des bases ou qui bloquent les fourches de réplication et de transcription. Parmi ces lésions, on compte les dimères cyclobutyliques de pyrimidines causés par les rayonnements ultraviolets. Chez les eucaryotes, le système NER est composé de plus de 25 protéines. Le système NER eucaryote possède deux voies d'initiation de la réparation : la voie du NER liée à la transcription (TCNER) et la voie du NER globale du génome (GGNER). Dans tous les cas, la détection d'une lésion entraîne la formation d'une cassure simple brin à quelques nucléotides de chaque côté de la lésion. Ces cassures libèrent le fragment contenant la lésion. La discontinuité est comblée par les ADN polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$ . Une ligation, probablement par l'ADN ligase I, termine la réparation.

### **Réparation des cassures doubles brin par recombinaison**

Les cassures sur les deux brins de l'ADN ou DSB («Double Strand Break») peuvent être la conséquence de l'action d'agents génotoxiques externes ou internes (ultraviolets, radiations ionisantes, oxygène réactif) (Doutriaux *et al.* 1998) ou de processus cellulaires (accident de réplication ou de réparation, tensions dans la molécule d'ADN) (Bai *et al.* 1999). Les DSB sont aussi nécessaires dans certains processus comme la recombinaison génétique à la méiose et les réarrangements des gènes des immunoglobulines (Grelon *et al.* 2001). Lors



d'une DSB, les deux brins d'ADN sont endommagés : il n'y a donc pas de brin modèle pouvant servir à la récupération de l'information génétique. La réparation des DSB chez les plantes (revue dans Bleuyard *et al.* 2005) peut se faire par plusieurs systèmes de réparation dont l'action se chevauche. Nous décrivons ici seulement la voie de la réparation des DSB par recombinaison homologue (DSBR).

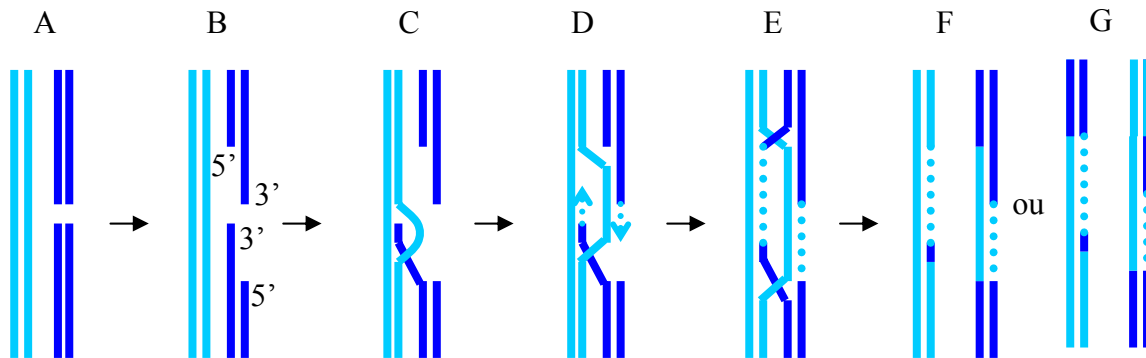


Figure 2 : Schéma de la réparation des DSB par recombinaison homologue (DSBR).

La réparation des DSB par recombinaison homologue (DSBR) (voir figure 2) débute par la résection de la DSB pour former une extrémité 3' simple brin (figure 2 B). L'exonucléase Exo1 pourrait également être impliquée dans la résection. La résection est exécutée chez les vertébrés par le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) et est suivie de la liaison de Rad52. Avec l'aide des protéines Rad55 et Rad57, Rad 52 recrute Rad51 (un homologue de la recombinaison bactérienne RecA) qui forme un nucléofilament sur l'ADN simple brin. Ce nucléofilament permet l'invasion par l'ADN simple brin du duplexe d'ADN homologue de la chromatide soeur (figure 2 C) qui sert de gabarit pour allonger l'ADN. Le déplacement du brin homologue permet la capture de la seconde extrémité 3' (figure 2 D). Après synthèse de l'ADN et ligation, il y a formation d'une double jonction de Holliday (DJH) (figure 2 E) qui est ensuite coupée pour reformer deux duplexes d'ADN intacts (figure 2 F ou G). Ce mode de réparation est conservatif et son fonctionnement est très similaire à la recombinaison méiotique.

## **Le système de correction des mésappariements par excision d'un long fragment d'ADN (MMR)**

Le système de correction des mésappariements le plus important et le mieux connu est le MMR (pour «DNA MisMatch Repair»). Ce système dégrade un long fragment d'ADN (jusqu'à 1-2 kb) contenant le mésappariement. L'intervalle simple brin formé est rempli par une ADN polymérase, puis la cassure résiduelle est fermée par une ADN ligase. Des systèmes de réparation des mésappariements par excision de courts fragments (Coïc *et al.* 2000) ou très courts fragments (Marti *et al.* 2002) peuvent également être présents chez certains organismes. Le premier système MMR identifié, et aussi le mieux caractérisé, est le système MutHLS dirigé par la méthylation chez *E. coli*. Les systèmes MMR eucaryotes les mieux connus sont ceux de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), de la souris (*Mus Musculus*, Mm) et de l'humain (*Homo sapiens*, Hs). En revanche, le système MMR chez les plantes est très peu connu.

### **Le système MMR chez *E. coli***

L'existence du système MutHLS dirigé par la méthylation chez *E. coli* a été démontrée en 1975 par Wildeberg et Meselson (Wildeberg et Meselson 1975). Ce système est principalement composé des protéines MutS, MutL et MutH. La protéine MutS reconnaît le mésappariement, s'y lie et permet le recrutement de MutL. Le complexe MutS/MutL se déplace sur l'ADN en hydrolysant l'ATP et active l'endonucléase MutH qui insère une cassure simple brin sur le brin d'ADN non méthylé nouvellement synthétisé. Une hélicase (MutU) et des exonucléases (RecJ, ExoVII, ExoI ou ExoX) déroulent et dégradent le brin d'ADN nouvellement synthétisé jusqu'au mésappariement. L'ADN polymérase III remplit l'intervalle simple brin formé puis la cassure est refermée par une ligase. Le système MMR MutHLS reconnaît et répare tous les mésappariements de base (sauf C/C) ainsi que les courtes boucles d'insertion/délétion (ou IDL pour «Insertion/Deletion Loop») provenant d'erreurs de réplication de l'ADN. Le système MMR reconnaît aussi les hétérologies produites lors de la recombinaison, ainsi que certaines lésions causant la formation d'un mésappariement (méthylation, désamination ou oxydation de base) ou pouvant déformer la structure de l'ADN (pontage par le cisplatine) (Stojic *et al.* 2004).

La structure 3D de la protéine MutS a été élucidée. Cette protéine contient 5 domaines fonctionnels : I) liaison au mésappariement, II) connecteur, III) domaine central, IV) domaine levier-pince ('lever-clamp') et V) domaine ATPase (Marti *et al.* 2002). Les domaines I et IV se lient à l'ADN. Le domaine V contient l'interface de dimérisation. MutS fonctionne en dimère de 95 kDa qui entoure l'ADN. Les deux monomères de MutS ont des interactions différentes avec l'ADN (Marti *et al.* 2002, Kunkel et Erie 2005). La détection initiale des mésappariements par MutS semble se faire en déformant l'ADN (Isaacs et Spielmann 2004). La liaison du dimère de MutS stimule l'échange d'ADP pour de l'ATP. Ceci cause un changement de conformation du dimère vers une structure en pince glissante («sliding clamp») qui peut se déplacer sur l'ADN jusqu'à 1 kb du mésappariement, permettant ainsi le chargement successif de plusieurs pinces glissantes de MutS sur l'ADN (Kolas et Cohen. 2004). De plus, le changement de conformation du dimère de MutS permet le recrutement d'un dimère de MutL. Le canal qui accomode l'ADN dans le dimère MutS est double et pourrait accueillir deux molécules d'ADN en même temps. Il a été suggéré que ce double canal joue un rôle dans les étapes de recherche d'homologie lors de la recombinaison (Kunkel et Erie 2005).

La protéine MutL a un rôle d'intermédiaire moléculaire et fonctionne sous la forme d'un dimère de 68 kDa (Kunkel et Erie 2005). Le dimère de MutL peut interagir avec d'autres protéines du MMR et moduler leurs effets, il peut lier et hydrolyser l'ATP et il peut se lier à l'ADN. La structure 3D de MutL a été résolue pour la région contenant l'activité ATPase sur laquelle sont retrouvées une partie des fonctions de liaison à l'ADN et une partie des fonctions d'interaction avec d'autres protéines. La structure des régions nécessaires à la dimérisation et à l'interaction avec les protéines du système MMR n'est pas connue. Le complexe MutS/MutL est capable de réaliser une translocation sur l'ADN dépendant de l'hydrolyse de l'ATP. Ce complexe (contenant de l'ATP) est nécessaire à l'activation de MutH. C'est un contact direct avec MutL qui active MutH. De plus, MutL interagit également avec l'hélicase II (UvrD) qui sépare les deux brins de l'ADN.

La protéine MutH est une endonucléase de 25 kDa qui se lie aux sites *dam* hémiméthylés chez *E. coli* (Marti *et al.* 2002). L'hémiméthylation fait office de signal de discrimination du brin nouvellement synthétisé (Modrich et Lahue. 1996). L'activation de MutH entraîne la formation d'une cassure sur le brin d'ADN non-méthylé jusqu'à 2 kb en 3' ou en 5' du mésappariement (Modrich et Lahue. 1996).

Une fois les deux brins séparés par l'hélicase II (UvrD), l'ADN cassé est dégradé en direction du mésappariement par diverses exonucléases 3'-5' ou 5'-3'. L'intervalle d'ADN simple brin est ensuite comblé par l'ADN polymérase III avec l'aide de SSB («Single Stranded DNA Binding protein», l'équivalent bactérien de RPA). Cette spécificité du système MMR pour la polymérase responsable de la réplication ainsi que l'interaction de MutS avec la « $\beta$  sliding clamp» (l'équivalent bactérien de PCNA) suggèrent une relation très proche entre le système MMR et la machinerie de réplication.

### **Le système MMR des eucaryotes**

Les homologues de MutS et MutL ont été fortement conservés au cours de l'évolution. Plusieurs homologues de ces deux protéines ont été retrouvés chez tous les organismes modèles eucaryotes (voir tableau 1). Les multiples homologues eucaryotes de MutS et MutL fonctionnent en hétérodimères avec une spécialisation de fonction.

Les systèmes MMR eucaryotes les mieux connus sont ceux de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), de la souris (Mm) et de l'humain (Hs). La plupart des homologues eucaryotes de MutS et de MutL ont été nommés et classifiés en fonction de ceux trouvés chez la levure. La description du système MMR des eucaryotes qui suit est un amalgame des connaissances acquises chez ces trois organismes. En général, les descriptions s'appliquent aux trois systèmes. Les codes d'identification à deux lettres (Sc, Mm et Hs) seront utilisés pour désigner une composante particulière à un organisme.

Tableau 1 : Diversité des homologues de MutS et MutL chez les eucaryotes.

Informations tirées des bases de données du NCBI et de TAIR.

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>A. thaliana</i>
MutS	MSH1	ni	ni	MSH1/CHM
	MSH2	MSH2	MSH2	MSH2
	MSH3	MSH3	MSH3	MSH3
	MSH4	MSH4	MSH4	MSH4
	MSH5	MSH5	MSH5	ni
	MSH6	MSH6	MSH6	MSH6
	ni	ni	ni	MSH7 <sup>1</sup>
MutL	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1
	PMS1	PMS2	PMS2	PMS1
	MLH2	PMS1 <sup>2</sup>	ni	ni
	MLH3	MLH3	MLH3	MLH3
	ni	PMS2L/PMS2R <sup>3</sup>	ni	ni

ni = non identifié

<sup>1</sup> Paralogue de MSH6 unique aux plantes.<sup>2</sup> Homologie imparfaite avec ScMLH2.<sup>3</sup> Famille de gènes apparentés (Nicolaidis *et al.* 1995, Osborne *et al.* 1997).

Le système MMR chez les eucaryotes remplit essentiellement les mêmes fonctions que celui de *E. coli*, c'est-à-dire la correction des mésappariements de bases (sauf les C/C) et des courtes IDL qui sont générées lors de la réplication de l'ADN. Cependant, certains homologues eucaryotes des protéines MutS et MutL remplissent des fonctions qui n'ont pas de liens avec le système MMR. Ainsi, certains servent à signaler les dommages en lien avec les «checkpoints» cellulaires et l'apoptose, tandis que d'autres sont impliqués dans la formation des «crossing-over». Le système MMR exerce aussi un contrôle sur la recombinaison homéologue (Surtees *et al.* 2004).

Les étapes de la reconnaissance des mésappariements et de la formation des complexes entre les homologues de MutS et MutL sont similaires à ce qui est connu chez *E. coli*, mais avec quelques particularités dues au fonctionnement en hétérodimères et à la spécialisation des différents homologues. Cependant, aucun homologue de MutH n'a été retrouvé chez les eucaryotes. L'identification du brin d'ADN nouvellement synthétisé semble se faire par la présence d'une discontinuité en 3' du mésappariement dans la région de la fourche de réplication : les fragments d'Okazaki sur le brin retardataire et l'extrémité de l'ADN sur le

brin mineur (Kunkel et Erie 2005). La dégradation de l'ADN se fait toujours dans les sens 3'-5' et semble être réalisée par l'exonucléase EXO1 ou par l'activité exonucléase 3'-5' des ADN polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$  (Marti *et al.* 2002). Aucune hélicase eukaryote n'a pu être spécifiquement reliée au système MMR. La nouvelle synthèse de l'ADN se fait probablement par l'ADN polymérase  $\delta$  (Kunkel et Erie 2005).

Tableau 2 : Résumé des homologues de MutS et MutL chez les mammifères.

<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	dimérise avec	dimère	fonction MMR	autres fonctions
MSH2	MSH2	MSH3 et 6	MutS $\alpha$ et $\beta$	MSH central MMR	-
MSH3	MSH3	MSH2	MutS $\beta$	IDL $\leq$ 8 nuc	-
MSH4	MSH4	MSH5	MutS $\delta^3$	?	recombinaison
MSH5	MSH5	MSH4	MutS $\delta^3$	?	recombinaison
MSH6	MSH6	MSH2	MutS $\alpha$	MM <sup>1</sup> et IDL <sup>2</sup>	-
MLH1	MLH1	tous	tous	MLH central MMR	chiasma
PMS2	PMS2	MLH1	MutL $\alpha$	avec MutS $\alpha$ et $\beta$	méiose
PMS1	ni	MLH1	MutL $\gamma^3$	avec MutS $\beta$ (IDL)	
MLH3	MLH3	MLH1	MutL $\beta^3$	avec MutS $\beta$ (IDL)	chiasma
PMS2R/L	ni	nd	nd	nd	nd

ni : Non identifié.

nd : Non déterminé.

<sup>1</sup> Mésappariements de base.

<sup>2</sup> Boucles insertion/délétion de 1 nucléotide.

<sup>3</sup> La nomenclature de ces hétérodimères varie selon certains auteurs.

### Constituants du système MMR des eucaryotes

Chez les eucaryotes, cinq homologues de MutS et trois homologues de MutL sont très conservés. Les homologues conservés de MutS sont MSH2 à MSH6 (pour «MutS Homologs») et les homologues conservés de MutL sont MLH1, MLH3 (pour «MutL Homologs») et PMS1 (pour «Post-Meiotic Segregation») (voir tableaux 1 et 2 et 3). Le système MMR de la levure serait responsable de la correction d'environ 70 à 80 % des mésappariements (Yang *et al.* 1999). L'inactivation du système MMR diminue fortement le contrôle de la recombinaison homéologue (Modrich et Lahue. 1996), cause une augmentation des taux de mutation (mutations ponctuelles et glissement) et cause une augmentation de la ségrégation post-méiotique (ou PMS). La PMS est une ségrégation de

caractères génétiques lors de la division mitotique qui suit la méiose. Elle est causée par la présence d'un hétéroduplexe d'ADN non réparé après un événement de recombinaison (voir figure 2 F et G). C'est ce phénotype particulier qui a permis d'isoler (et qui a nommé) *ScPMS1*, le premier gène MMR identifié chez les eucaryotes.

#### *Système MMR et homologues de MutS*

Presque tous les homologues eucaryotes de MutS contiennent les cinq domaines retrouvés chez MutS en plus d'un site de liaison à la protéine PCNA. Parmi les homologues de MutS, seuls MSH2, MSH3 et MSH6 sont impliqués dans le MMR nucléaire (Yang *et al.* 1999, Kirkpatrick 1999, Marti *et al.* 2002, Kunkel et Erie 2005). MSH2 est l'homologue de MutS qui joue le rôle central dans le MMR eucaryote. Cette protéine forme un hétérodimère soit avec MSH6 ou MSH3. Les hétérodimères MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6) et MutS $\beta$  (MSH2/MSH3) ont des fonctions partiellement redondantes dans la reconnaissance des mésappariements. MutS $\alpha$  reconnaît les mésappariements de bases et les boucles d'insertion/délétion de 1 ou 2 nucléotides tandis que MutS $\beta$  reconnaît les courtes boucles d'insertion/délétion (jusqu'à 14 nucléotides selon les organismes). Les hétérodimères MutS $\alpha$  et  $\beta$  reconnaissent et se lient aux mésappariements puis ils recrutent les homologues de MutL. Ils peuvent également interagir avec la protéine PCNA qui est impliquée dans la réplication de l'ADN. L'inactivation de MSH2 cause l'inactivation du système MMR (augmentation des mutations, augmentation de la recombinaison homéologue et de la ségrégation post-méiotique chez la levure, cancers chez les mammifères). Un effet similaire est causé par l'inactivation simultanée de MSH3 et de MSH6. Les mutants individuels de MSH3 et MSH6 montrent des phénotypes de déficience partielle du système MMR.

ScMSH1 a une fonction essentielle dans le maintien du génome mitochondrial chez la levure (Dzierzbicki *et al.* 2004, Reenan et Kolodner 1992). La réparation de l'ADN chez les mitochondries est peu connue, mais ScMSH1 semble y jouer des rôles similaires à ceux du système MMR nucléaire ainsi que des fonctions en lien avec la recombinaison. L'inactivation de ScMSH1 cause une perte de fonction rapide des mitochondries. Cet

homologue de MutS n'a pas été identifié chez les mammifères, mais il est présent chez les plantes.

#### *Système MMR et homologues de MutL*

MLH1 a un rôle central parmi les homologues de MutL : il est le partenaire d'interaction universel lors de la formation des hétérodimères (Marti *et al.* 2002, Kunkel et Erie 2005). Cette protéine forme des hétérodimères avec PMS1, MLH2 ou MLH3. Chez la levure, l'hétérodimère MutL $\alpha$  est formé par ScMLH1 et ScPMS1. MutL $\alpha$  interagit avec MutS $\alpha$  et  $\beta$  lorsqu'ils sont liés à un mésappariement. MutL $\alpha$  est nécessaire à la correction efficace des mésappariements de base et des IDL par le système MMR.

ScMLH1 et ScMLH2 forment l'hétérodimère MutL $\gamma$  qui est impliqué, avec ScMSH3, dans la réparation d'une portion des boucles d'insertion/délétion. MLH1 et MLH3 forment l'hétérodimère MutL $\beta$ , qui est lui aussi impliqué avec MSH3 dans la réparation d'une portion des boucles d'insertion/délétion. Cependant, la fonction principale de MutL $\beta$  semble être au niveau de la formation des «crossing-over» lors de la méiose (Hunter et Borts 1997, Hoffmann et Borts. 2004).

Il y a une variation de la nomenclature des homologues de MutL chez les mammifères. La protéine appelée PMS1 chez la levure est appelée PMS2 chez les mammifères et ScMLH2 est l'homologue des protéines PMS1 chez les mammifères.

#### **Les homologues de MutS et MutL avec fonction méiotique**

MSH4, MSH5, MLH1 et MLH3 ont un rôle important dans la formation des «crossing-over». MSH4 et MSH5 (Kirkpatrick 1999, Argueso *et al.* 2004, Novak *et al.* 2001) sont spécifiques à la méiose et peuvent former un hétérodimère que nous désignerons ici MutS $\delta$  (certains auteurs le désignent MutS $\gamma$ ). L'inactivation de ces gènes n'a pas d'effet sur le système MMR mais la fréquence de «crossing-over» est fortement diminuée et on observe



une mortalité importante des spores ou des gamètes compatible avec une non-disjonction des chromosomes en métaphase I de la méiose. De façon semblable, l'inactivation de MLH1 ou de MLH3 cause une baisse de 3 à 100 fois du nombre de chiasma (Hunter et Borts 1997, Wang *et al.* 1999, Baker *et al.* 1996). Des études par doubles mutants indiquent que ces effets sur la formation des chiasmas résultent d'une voie commune avec MSH4. PMS1 semble également avoir une fonction lors de la méiose qui est encore mal comprise. L'implication des homologues de MutS et de MutL dans la recombinaison méiotique est mieux comprise chez la souris que chez la levure et ces fonctions seront décrites plus en détail dans la section portant sur la méiose et la recombinaison.

### **Le système MMR chez *A. thaliana***

Le système MMR chez *A. thaliana* (et les plantes en général) est encore très peu connu. Six ou sept homologues de MutS et trois homologues de MutL ont été identifiés chez *A. thaliana* (voir tableau 3). Certains de ces homologues ont été clonés et caractérisés partiellement pour leurs fonctions dans le système MMR. Une part importante de ces travaux a été réalisée dans notre laboratoire.

### **Homologues de MutS**

AtMSH1 (initialement identifié comme CHM pour 'Chloroplast Mutator') (Abdelnoor *et al.* 2003) est exporté vers les mitochondries et probablement aussi vers les chloroplastes. Il contient le domaine MutS ATPase (avec les séquences de dimérisation) et le domaine de liaison à l'ADN. Les trois autres domaines de MutS n'ont pas été identifiés. L'inactivation de MSH1 affecte la recombinaison du génome des mitochondries, mais ne semble pas causer d'accumulation de mutations ponctuelles. Ce phénotype pourrait provenir de la dérégulation de la recombinaison homéologue dans les mitochondries. MSH1 est très conservé chez les plantes.

Tableau 3 : Résumé des homologues de MutS et MutL chez *A. thaliana*.

Identification des homologues par les bases de données du NCBI et de TAIR.

Homologues de MutS	dimérise avec	dimère	fonction MMR <sup>F</sup>	autres fonctions
MSH1/CHM <sup>A</sup>	?	?	mitochondries chloroplastes ?	mitochondries chloroplastes?
MSH2 <sup>B,C</sup>	MSH3, 6 et 7	MutS $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$	MSH central MMR	nd
MSH3 <sup>B</sup>	MSH2	MutS $\beta$	IDL1 <sup>2</sup> et IDL3 <sup>2</sup>	nd
AT3G30475 <sup>1</sup>	nd	nd	nd	nd
MSH4 <sup>H</sup>	nd	oui?	non	recombinaison
MSH6 <sup>B,G</sup>	MSH2	MutS $\alpha$	MM <sup>4</sup> et IDL1 <sup>2</sup>	nd
MSH7 <sup>B,G</sup>	MSH2	MutS $\gamma$	MM <sup>4</sup>	nd
Homologues de MutL	dimérise avec	dimère	fonction MMR	autres fonctions
MLH1 <sup>D</sup>	nd	nd	nd	nd
PMS1 <sup>E</sup>	nd	nd	IDL	nd
MLH3	nd	nd	nd	nd

nd : Non déterminé.

<sup>1</sup> Séquence homologue à MSH3.<sup>2</sup> Boucles d'insertion de 1 nucléotide (T).<sup>3</sup> Boucles d'insertion de 3 nucléotides (AAG).<sup>4</sup> Mésappariement.Références : A) Abdelnoor *et al.* 2003 ; B) Adé *et al.* 1999, Culligan et Hays 2000 ; C) Leonard *et al.* 2003 ; D) Jean *et al.* 1999 ; E) Alou *et al.* 2004 ; F) Leonard *et al.* 2003 ; G) Wu *et al.* 2003 ; H) Higgins *et al.* 2004

MSH2, MSH3, MSH6 et MSH7 semblent tous impliqués dans le système MMR d'*A. thaliana*. Des homologues de MSH7 ont été également identifiés chez le maïs (Horwath *et al.* 2002) et le blé (Dong *et al.* 2002). La séquence de MSH7 est proche de celle de MSH6 mais sans le domaine IV des homologues de MutS (domaine 'pince-levier') (Wu *et al.* 2003). MSH2 est le partenaire des trois autres protéines lors de la formation des hétérodimères MutS $\beta$  (MSH3), MutS $\alpha$  (MSH6) et MutS $\gamma$  (MSH7) (Culligan et Hays 2000). Ces trois hétérodimères ont été testés pour leur capacité à lier certains mésappariements *in vitro*. MutS $\alpha$  et MutS $\beta$  ont des affinités comparables à celles de leurs équivalents chez les mammifères. MutS $\gamma$  montre un patron de liaison légèrement différent de MutS $\alpha$ , avec une préférence relative différente pour les mésappariements de bases et une affinité très faible pour les boucles d'insertion/délétion (Wu *et al.* 2003). L'inactivation d'AtMSH2 cause une

instabilité des microsatellites (Leonard *et al.* 2003) ce qui relie clairement AtMSH2 au système MMR *in vivo*.

AtMSH4 est spécifiquement exprimé à la méiose et est visible par immunofluorescence selon un patron de disposition semblable à MmMSH4 (Higgins *et al.* 2004). L'inactivation d'AtMSH4 cause un défaut sévère de la synapse, une baisse d'environ 85 % du nombre de chiasmas (72 % de chromosomes sans chiasma) et les foyers d'AtMLH3 n'apparaissent pas. Les chiasmas résiduels sont indépendants de l'interférence. AtMSH4 contient les séquences de dimérisation mais, comme l'homologue de MSH5 n'a pas été identifié chez *A. thaliana*, son partenaire de dimérisation est incertain.

Le septième homologue possible de MutS identifié *in silico* (AT3G30475) présente une ressemblance avec MSH3. Il n'a fait l'objet d'aucune publication et son identité d'homologue de MutS n'a pas été confirmée.

### **Homologues de MutL**

Parmi les homologues de MutL identifiés chez *A. thaliana*, PMS1 est le seul qui a été clairement lié à une fonction. Il a été démontré dans notre laboratoire (Alou *et al.* 2004) que PMS1 est impliqué dans le système MMR chez *A. thaliana*. Un mutant d'inactivation par surproduction d'un allèle dominant négatif (une mutation dans le motif de liaison à l'ATP) montrait une instabilité somatique du nombre de répétitions d'un microsatellite artificiel lié à un système rapporteur. *MLH1* a été cloné dans notre laboratoire (Jean *et al.* 1999), mais aucune caractérisation de sa fonction n'a encore été rapportée. Finalement *MLH3* a été identifié *in silico* et n'a pas encore été caractérisé.

Ainsi, même si de nombreux homologues de MutS et MutL ont été identifiés chez *A. thaliana*, leur analyse fonctionnelle ne fait que commencer. Dans certains cas, leur implication dans la correction des mésappariements est bien établie (Leonard *et al.* 2003, Alou *et al.* 2004). Plus récemment, Li *et al.* (sous presse) ont mis en évidence le rôle

d'AtMSH2 dans la régulation de la fréquence de recombinaison homéologue. Cependant, très peu de travaux ont porté sur les rôles méiotiques de ces protéines.

## La méiose

La méiose est la division cellulaire spécialisée qui produit quatre gamètes haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Lors de la méiose, les chromosomes subissent deux rondes de ségrégation après une seule ronde de réplication de l'ADN. La seconde ségrégation des chromosomes méiotiques ressemble à la division mitotique. Cependant, lors de la première ronde de ségrégation, ce sont les chromosomes homologues qui sont séparés. Cette situation inhabituelle demande une coordination particulière des homologues pour assurer leur ségrégation correcte. Cette coordination est installée lors de la prophase méiotique et nécessite l'appariement et la synapse des homologues ainsi que la recombinaison génétique et la formation de chiasmas.

Tableau 4 : Marqueurs cytogénétiques, cytologiques et moléculaires choisis des étapes de la prophase méiotique. Adapté de Roeder 1997.

Stade	Morphologie des Chr <sup>1</sup> / Synapse et SC <sup>2</sup>	Signes cytologiques de la recombinaison	Signes moléculaires de la recombinaison <sup>3</sup>
Leptotène	Longs filaments / Apparition élément axial	Nodules précoces ( <i>'Early Nodules'</i> ).	Apparition des DSB
Zygotène	Longs filaments / Initiation synapse	Nodules précoces ( <i>'Early Nodules'</i> ).	Disparition des DSB
Pachytène	Chr identifiables / Synapse complète	Nodules tardifs ( <i>'Late Nodules'</i> ).	Double jonction de Holliday
Diploène	Début condensation Chr / Dissociation du SC	Chiasma	Recombinants matures
Diacinèse	Fin condensation Chr	Chiasma	

<sup>1</sup> Chromosomes.

<sup>2</sup> Complexe synaptonémal.

<sup>3</sup> Observés chez *S. cerevisiae*.

## La prophase méiotique : appariement, synapse, recombinaison et chiasmas

La prophase est de loin l'étape la plus longue et la plus complexe de la méiose. Elle débute approximativement lorsque les chromosomes deviennent visibles (suite à une première condensation). À ce moment, la réplication de l'ADN est complétée. La prophase méiotique a été subdivisée en plusieurs étapes selon l'organisation des chromosomes (voir figure 3 A et tableau 4) (Dawe 1998, Roeder 1997).

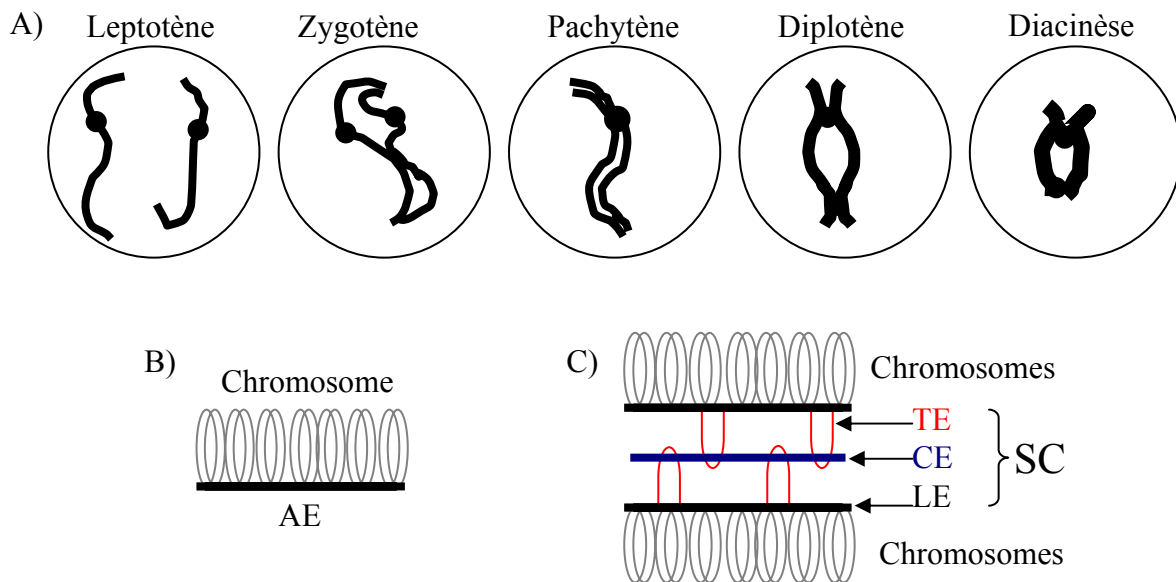


Figure 3 : Représentation des chromosomes en prophase méiotique.

- A) Apparence générale des chromosomes aux différents stades de la prophase.
- B) Schéma d'une section de chromosome associé à l'élément axial (AE) au leptotène.
- C) Schéma d'une section de chromosomes homologues reliés par le complexe synaptonémal (SC) composé des éléments latéraux (LE), centraux (CE) et transverses (TE).

Au **leptotène**, les chromosomes sont visibles sous la forme de très longs filaments composés de deux chromatides soeurs. Les chromatides soeurs sont liés à l'élément axial (AE), une structure protéique qui les maintient dans une configuration en boucle (voir figure 3 B). Au **zygotène**, les chromosomes homologues sont appariés et ils débutent la synapse. La synapse s'établit par le biais du complexe synaptonémal (SC). Le SC est composé de trois éléments protéiques : 1) l'élément latéral (LE) qui correspond à l'AE, 2)

l'élément central (CE) situé entre les deux chromosomes et 3) l'élément transverse (TE) qui relie le LE et le CE (voir figure 3 C). C'est à ce stade qu'est initiée la recombinaison génétique. Le **pachytène** est marqué par la synapse complète des chromosomes homologues. La recombinaison génétique progresse et les chiasmas sont formés. La dissociation du SC au **diplotène** amène la séparation des chromosomes homologues qui restent attachés uniquement par les chiasmas. Finalement, à la **diacinèse**, les chromosomes sont complètement condensés et sont prêts pour les divisions méiotiques.

### Les divisions méiotiques

Lors de la première division méiotique, les chromosomes homologues sont séparés (voir figure 4). Les chromosomes, éparpillés dans le noyau à la fin de la prophase, se regroupent sur une plaque à la métaphase I. Lors de l'anaphase I, les chromosomes homologues se séparent, puis migrent vers les deux pôles de la cellule. À la télophase I, les deux groupes de chromosomes sont bien séparés. Chez certains organismes, la cellule se divise alors en deux. Il y a aussi parfois une interphase avec reprise de l'activité métabolique, mais il n'y a jamais de réplication de l'ADN. Chez les microsporocytes d'*Arabidopsis thaliana*, il n'y a pas de division de la cellule à la télophase I et il n'y a pas d'interphase : les méiocytes passent directement de la télophase I à la prophase II.

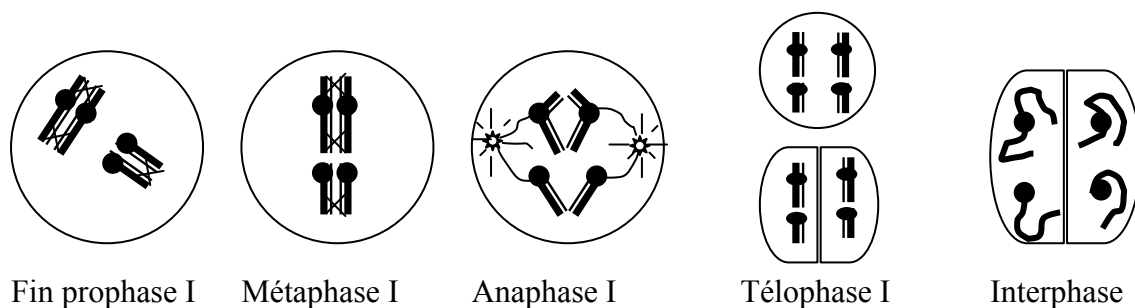


Figure 4 : Représentation des étapes de la première division de la méiose.

Les cercles représentent les centromères, les X représentent les chiasmas.

Lors de la seconde division méiotique, les chromatides soeurs sont séparés (voir figure 5). Cette division est similaire à la division mitotique. Les chromosomes se condensent de nouveau en prophase II, puis chaque groupe s'aligne sur une plaque à la métaphase II. Lors de l'anaphase II, les centromères se séparent puis les chromatides soeurs migrent vers les deux pôles de la cellule. À la télophase II, les quatre groupes de chromosomes sont bien séparés et la cellule se divise en quatre cellules filles haploïdes. Les groupes de quatre cellules filles formées par les microsporocytes des plantes juste après la méiose sont appelés tétrades.

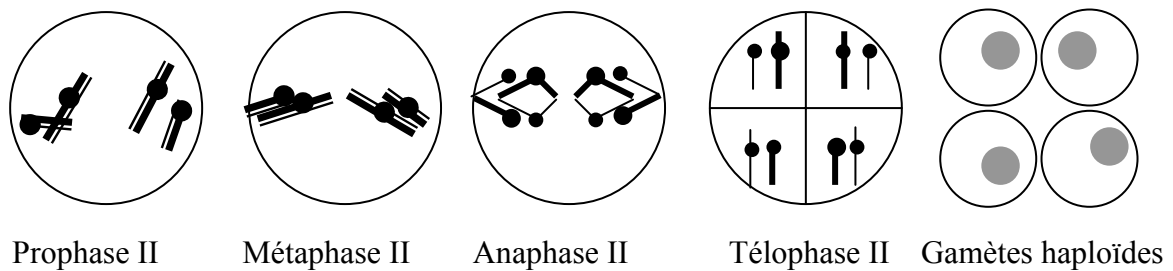


Figure 5 : Représentation des étapes de la seconde division de la méiose.

### Mécanismes moléculaires de la recombinaison méiotique

Les mécanismes moléculaires de la recombinaison génétique sont assez bien connus et ils ressemblent beaucoup aux mécanismes de la DSB. Les protéines impliquées semblent très conservées chez les eucaryotes (Caryl *et al.* 2003).

Il existe deux types de recombinaison à la méiose : la recombinaison avec échange réciproque et la recombinaison sans échange. La recombinaison sans échange est responsable des événements de conversion génique et sert à l'initiation de la synapse. La recombinaison avec échange réciproque est responsable de la recombinaison génétique et de la formation des chiasmata. Le choix entre ces deux voies se fait par le biais du phénomène d'interférence et ne semble pas affecter l'initiation de la recombinaison mais plutôt le choix des intermédiaires moléculaires. L'interférence est le phénomène par lequel la présence d'un chiasma inhibe la formation d'autres chiasmata rapprochés sur le même

chromosome et qui assure aussi la présence d'au moins un chiasma sur chaque paire de chromosomes homologues.

Tous les événements de recombinaison sont initiés par une DSB introduite par l'endonucléase SPO11 après la réplication de l'ADN (durant le leptotène)(Schwarzacher 2003, Svetlanov et Cohen 2004). Il existe deux patrons de formation des DSB chez les eucaryotes. Chez la plupart des eucaryotes (levure, souris, *A. thaliana*) la présence des DSB est nécessaire à la synapse et à la formation du SC. À partir de la DSB, les protéines Mre11, Rad50 et Com1/Sae2 (Petronczki *et al.* 2003) exécutent une résection 5'-3' qui produit une extrémité 3' simple brin. L'extrémité simple brin sert ensuite à la recherche d'homologie et à l'invasion du duplexe homologue (Petronczki *et al.* 2003, Schwarzacher 2003, Svetlanov et Cohen 2004). Les homologues de RecA, Rad51 (voir DSBR) et Dmc1 (un homologue spécifique à la méiose), sont responsables de la catalyse de l'invasion. Le rôle de DMC1 est probablement d'orienter la recombinaison vers une molécule d'ADN du chromosome homologue au lieu de la chromatide soeur utilisée dans le DSBR. Les protéines Rad54, MND1, RPA, ATM et les hélicases RecQ seraient aussi impliquées dans ces étapes. L'invasion du duplexe homologue par la région 3' simple brin est propagée par la synthèse d'ADN. Lors de la recombinaison sans échange, le brin envahisseur est rapidement relâché pour permettre la réparation de la cassure (Petronczki *et al.* 2003). Ceci entraîne la formation d'un court hétéroduplexe d'ADN qui peut causer de la conversion génique suite à la réparation des mésappariements ou une ségrégation post-méiotique en absence de correction des mésappariements.

La recombinaison avec échange réciproque passe par un intermédiaire de DHJ comme le DSBR (Caryl *et al.* 2003, Svetlanov et Cohen 2004, Petronczki *et al.* 2003) : la seconde extrémité 3' simple brin est capturée, la synthèse de l'ADN expose les extrémités 5' de la DSB qui envahissent l'ADN nouvellement synthétisé puis sont liées par une ligase. Ceci forme une molécule d'ADN jointe dans une conformation de DHJ (voir figure 2 D). La DHJ est ensuite coupée par une résolvasse non identifiée. La plupart des DHJ sont résolues par une coupure asymétrique qui produit un échange réciproque entre les deux molécules d'ADN. Les DHJ sont formées au pachytène et sont résolues au diplotène. La résolution de



la recombinaison vers un «crossing-over» nécessite l'activité de MSH4, MSH5, MLH1 et MLH3. Il existe un second mécanisme de formation de recombinaison avec échange qui ne passe pas par les DHJ et qui est indépendant de l'interférence. Ce mécanisme est moins bien connu et représente environ 10 à 20 % des événements chez *A. thaliana* (Higgins *et al.* 2004).

### **Fonction des homologues de MutS et de MutL dans la recombinaison**

Les mutants d'inactivation pour les gènes *MmMLH1* (Edelmann *et al.* 1996, Baker *et al.* 1996, Woods *et al.* 1999), *MmMLH3* (Lipkins *et al.* 2002), *MmPMS2* (Baker *et al.* 1995), *MmMSH4* (Kneitz *et al.* 2000) et *MmMSH5* (Kneitz *et al.* 2000, de Vries *et al.* 1999) ont tous montré des défauts de la méiose. Les mutants *Mmmsh4* et *Mmmsh5* ont des phénotypes similaires : un défaut de synapse des chromosomes homologues qui cause l'arrêt de la méiose puis l'apoptose. Chez ces mutants, il y a formation des DSB nécessaires à la recombinaison mais une surabondance de Rad51 suggère un défaut dans l'invasion du duplexe d'ADN homologue (Svetlanov et Cohen 2004, Kolas et Cohen. 2004). Les mutants *Mmmlh1* et *Mmmlh3* présentent des phénotypes similaires : la synapse est normale, mais le très faible nombre de chiasmas produits cause la dissociation des homologues après le démontage du SC. Cette situation entraîne un arrêt de la méiose puis l'apoptose.

*MmMSH4* est présent dans les nodules de recombinaison contenant Rad51 (les ERN) et il reste associé aux nodules après la relâche de Rad51 et l'apparition de RPA. Le nombre de foyers MSH4 diminue ensuite pour atteindre environ le double du nombre de chiasmas. Une fraction de ces foyers MSH4 interagissent par la suite avec MLH1 et MLH3 (Svetlanov et Cohen 2004). Une manière d'interpréter ces résultats est que MSH4 est présent sur les structures d'ADN hybrides formées lors de la recombinaison

*MmMLH3* se lie au complexe synaptonémal des chromosomes méiotiques aussi tôt qu'au zygotène, avant d'être rejoint par *MmMLH1* (Kolas et Cohen. 2004). *MmMLH1* est présent dans les nodules de recombinaison tardifs (LRN) des chiasmas (Marcon et Moens 2003).

Cependant, un faible nombre de foyers MmMLH3 restent présents sur les chromosomes méiotiques sans adjonction de MmMLH1. Cette situation laisse supposer que MLH3 pourrait fonctionner seul ou avec un autre partenaire que MmMLH1 (peut-être MmPMS2).

MSH4 et MSH5 semblent nécessaires à l'initiation de la recombinaison tandis que MLH1 et MLH3 sont nécessaires pour la progression vers les DHJ ou pour leur résolution. En se basant sur le fonctionnement habituel des protéines du MMR, il est probable que la présence de l'hétérodimère MutS $\delta$  dans sa forme activée permet de recruter l'hétérodimère MutL $\beta$ . La présence de MutS $\delta$  activée serait limitée aux futurs sites de DHJ par le phénomène de l'interférence. MutL $\beta$  pourrait ensuite recruter les protéines nécessaires à la progression et à la résolution des DHJ.

### **Implication du système MMR à la méiose**

La correction des mésappariements par le système MMR à la méiose s'effectue sur les mésappariements formés lors de la réplication de l'ADN ainsi que sur ceux présents dans les hétéroduplexes d'ADN formés lors de la recombinaison. Le fonctionnement du système MMR lors de réplication pré-méiotique de l'ADN a été peu étudié (Surtees *et al.* 2004) mais est probablement similaire au fonctionnement mitotique décrit précédemment. La réparation de l'hétéroduplexe d'ADN par le système MMR empêche la ségrégation post-méiotique (PMS) et limite la recombinaison homéologue. La PMS est causée par la présence d'un hétéroduplexe d'ADN non réparé à la fin de la méiose : dans ce cas, les deux allèles différents se sépareront lors de la première division mitotique suivant la méiose. Le contrôle du système MMR sur la recombinaison homéologue s'accomplit par la «réparation» de l'hétéroduplexe pendant la formation de la DHJ et une déstabilisation de l'hétéroduplexe par les homologues de MutL (Surtees *et al.* 2004). La réaction de réparation cause la destruction de la structure de la DHJ et un abandon de l'événement de recombinaison. Il a aussi été suggéré qu'un mécanisme similaire pourrait être responsable de la recombinaison sans échange.

### **Implication de PMS1 dans la méiose et la recombinaison**

Il a été démontré que ScPMS1 assure ses fonctions MMR normales lors de la méiose. De plus, ScPMS1 et MmPMS2 ont aussi des fonctions à la méiose qui semblent indépendantes du système MMR. Dans les deux cas, l'inactivation du gène cause une baisse de la viabilité des spores ou des gamètes produits lors de la méiose. Le phénotype méiotique des mutants *Mmpms2* est difficile à interpréter : les mâles sont infertiles suite à des défauts de synapse, mais les femelles ont une fertilité normale (Baker *et al.* 1995). Environ 80 % des cellules méiotiques des souris mâles *pms2* observées au microscope montrent des défauts de synapse sévères : absence de synapse, synapses entre non-homologues, synapses entre plus de deux chromosomes et chromosome coincé entre deux chromosomes synapsés. Malgré cela, les taux de recombinaison génétique sont normaux (Qin *et al.* 2002) et la localisation de MLH1 et MLH3 sur les chromosomes méiotiques est normale (Kolas et Cohen. 2004). La cause de ces anomalies n'a pas été élucidée, mais certains auteurs postulent une fonction particulière de MmPMS2 en lien avec la réplication de l'ADN juste avant la méiose.

### ***Arabidopsis thaliana* comme plante modèle**

*A. thaliana* est la plante modèle la plus utilisée en génétique. Elle est facile à cultiver et elle est de petite taille (moins de 60 cm). Son cycle de vie est court (trois à quatre mois) et elle produit plusieurs milliers de graines. Ses fruits sont des siliques. Elle se reproduit généralement par autofécondation, ce qui permet d'obtenir facilement des individus homozygotes et de maintenir des lignées pures. Les fleurs sont abondantes et les croisements relativement faciles. Son génome, l'un des plus petits génomes végétaux (125 Mb), a été entièrement séquencé et contient 25,498 gènes codants pour des protéines appartenant à 11,000 familles (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

De nombreuses ressources en génomique fonctionnelle sont disponibles pour cette plante, incluant une dizaine de collections de lignées d'inactivation de gènes (le plus souvent par insertion aléatoire dans le génome) (TAIR, ressource Internet). L'un des mutagènes les plus

utilisés est le T-DNA inséré dans le génome végétal lors de l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* (Krysan *et al.* 1999). Ces différentes collections peuvent être criblées pour obtenir un mutant d'inactivation dans la plupart des gènes d'*A. thaliana* (Krysan *et al.* 1996).

La petite taille du génome d'*A. thaliana* facilite grandement les études génétiques, mais rend l'observation de ses chromosomes (la cytogénétique) particulièrement difficile. Le développement des techniques de visualisation au microscope à épifluorescence a cependant facilité l'observation cytogénétique de la mitose et de la méiose d'*Arabidopsis thaliana*. Le complément haploïde d'*A. thaliana* est composé de cinq chromosomes qui sont difficiles à différencier les uns des autres par les techniques classiques de coloration cytogénétique.

### **Méiose, sporogénèse et gamétogénèse**

Suite à la méiose, les spores haploïdes des plantes se divisent pour former les gamétophytes. Le gamétophyte mâle, aussi appelé microgamétophyte, est le sperme qui provient de la germination du pollen. Le gamétophyte femelle, aussi appelé mégagamétophyte, est le sac embryonnaire (Bowman 1994, Raven *et al.* 1999). La méiose des microsporocytes d'*A. thaliana* a été décrite à plusieurs reprises (voir entre autres Doutriaux *et al.* 1998, Peirson *et al.* 1997, Jones *et al.* 2003 ). Comme ces descriptions sont identiques à celle que nous faisons de la lignée témoin dans la section des résultats, elles ne seront pas reprises ici. La fécondité chez *A. thaliana* est liée au nombre de mégagamétophytes viables produits.

### **Microsporogénèse et microgamétogénèse chez *Arabidopsis thaliana***

Les microspores sont formées dans les anthères. Chez *A. thaliana*, plusieurs dizaines de cellules mères polliniques (PMC) sont formées par division mitotique et débutent la méiose simultanément. Chaque PMC donne naissance à une tétrade de spores haploïdes qui

donnera naissance à quatre grains de pollen. La spore subit une première division mitotique qui produit la cellule générative et la cellule du tube. La cellule générative subit une seconde division pour former les deux cellules de sperme. Ces cellules sont entourées d'une paroi protectrice pour former le grain de pollen.

### **Mégasporogénèse et mégagamétogénèse chez *A. thaliana***

Les mégaspores sont formées dans les ovules. Chaque ovule contient un mégasporocyte. Le méiocyte produit quatre mégaspores haploïdes. Celle située à la base de l'ovule formera le mégagamétophyte alors que les trois autres dégénéreront. Lors de la mégagamétogénèse, le noyau subit 3 divisions mitotiques successives pour former une cellule à 8 noyaux. Les noyaux prennent des positions spécifiques dans la cellule avant qu'elle ne se divise en 7 cellules avec 8 noyaux. Une des cellules uninucléées (l'oeuf) sera fertilisée par un noyau de sperme pour former l'embryon. Les deux synergides uninucléées fusionneront avec l'autre sperme pour former l'endosperme.

## OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Les travaux que j'ai effectués au cours de ma maîtrise s'inscrivaient parmi les efforts concertés de plusieurs étudiants à la maîtrise et au doctorat travaillant dans le laboratoire du Dr François Belzile. Cette équipe cherche à identifier et à caractériser le système de correction des mésappariements chez les plantes en utilisant principalement *Arabidopsis thaliana* comme modèle.

Ces recherches s'effectuaient à plusieurs niveaux, à la fois par la production, l'isolation et la caractérisation de lignées mutantes pour les différents gènes homologues de MutS et MutL. Les travaux qui sont décrits dans ce mémoire représentent une partie de la caractérisation de deux lignées portant une mutation dans le gène *AtPMS1*.

Étant donné l'implication des composantes du système MMR lors de la méiose chez les eucaryotes, particulièrement au niveau de la formation des crossing-over, nous posons l'hypothèse que l'inactivation d'*AtPMS1* causera un défaut de la méiose.

L'objectif principal de mes travaux était d'évaluer les effets phénotypiques méiotiques engendrés par l'inactivation de *PMS1* chez *Arabidopsis thaliana* dans le but de vérifier l'implication de *AtPMS1* à la méiose. Concrètement, trois catégories d'effets phénotypiques ont été étudiées :

1. la morphologie générale des plants et des organes reproducteurs ;
2. la fécondité (abondance et viabilité des graines) ;
3. le déroulement de la méiose chez les microsporocytes.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## Matériel végétal

Les lignées mutantes étudiées ont été gracieusement fournies par M. Eric Dion, étudiant au laboratoire du Dr François Belzile. Deux lignées mutantes indépendantes ont été utilisées : la lignée 4706 et la lignée 5368. Dans chacune d'elles, le gène *AtPMS1* est muté à la suite de l'insertion d'un T-DNA dans la région codante du gène. Les lignées mutantes 4706 et 5368 ont été isolées à partir de la population Alpha de l'*A. thaliana* Knockout Facility (AKF, ressource Internet). Cette population est composée de 60,480 mutants insertionnels d'*A. thaliana* de l'écotype WS (Wassilewskija) qui ont été obtenus par transformation (*Agrobacterium tumefaciens*) avec le vecteur de T-DNA pD991-AP3. En plus des mutants, des plantes sauvages de l'écotype WS (Wassilewskija) ont été employées comme témoins. Les plants mutants analysés étaient des générations T5 à T7.

## Conditions de culture en sol et de propagation des plantes

Les plants ont été cultivés en cabinet de croissance (Convicon, Winnipeg MB) ou dans une salle de culture dotée d'un éclairage artificiel (fluorescents 40W Cool White). Les conditions de culture étaient les suivantes : photopériode de 14-16 heures, température ambiante (22-28 °C, salle de culture) ou 25 °C (cabinet de croissance), humidité ambiante (40-60 %) avec arrosage au besoin et fertilisation hebdomadaire avec du 20-20-20. Les plantes étaient cultivées dans du terreau de marque Pro-Mix (Premier Horticulture, Dorval QC) en barquettes d'aluminium d'environ 15 sur 25 cm à raison de 12 à 15 plants par cabaret ou en pots de 7x7 cm à raison de 1 à 5 plants par pot. La levée de la dormance était obtenue en plaçant les graines à 4 °C dans une solution de Bacto-agar 0,2 % pendant 2 à 3 jours. Les graines utilisées pour la propagation étaient récoltées à la main à partir des plants sélectionnés.

## Génotypage

Une feuille de la rosette ou de la tige était prélevée lorsque la plante avait plus de six vraies feuilles. L'ADN a été extrait selon le protocole d'Edwards *et al.* (1991), puis utilisé dans une amplification PCR (36 cycles [45 sec / 94 °C ; 45 sec / 50 °C ; 2 min / 72 °C]) pour déterminer le génotype de chaque plante. Les amorces suivantes ont été utilisées (voir figures 6 et 7) :

AtPMS4	5'-CACAGATCTTTTGAATTTGACTAC-3'
AtPMS-FED2	5'-GCGAATAGCTTTACGTTTCCACTTA-3'
JL-202	5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3'

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'allèle sauvage du gène *AtPMS1* produit un amplicon de 2577 pb alors que les allèles mutants, présents chez les lignées 4706 et 5368, produisent respectivement des amplicons d'environ 0,2 et 2 kb.

## Évaluation de la fécondité des lignées

Deux méthodes d'évaluation de la fécondité ont été employées. Dans un premier cas, les plants ont été cultivés en salle de culture dans des pots de 7x7 cm à raison d'une plante par pot. À maturité, toutes les siliques de la tige principale ont été récoltées sur deux plants pour chaque génotype à l'étude. Les graines contenues dans chaque silique ont été dénombrées en excluant les petites graines (clairement non-viables). Le nombre moyen de graines par silique a été calculé pour chacun des génotypes. Dans la seconde expérience, les plants ont été cultivés en cabinets de croissance dans des pots de 7x7 cm à raison de 1 à 5 plants par pot et 5 pots par génotype. Les 10 premières siliques de la tige principale ont été récoltées sur chaque plante et les graines ont été dénombrées pour l'ensemble des dix siliques. Les moyennes obtenues ont été comparées entre les génotypes en faisant appel à un test de t réalisé à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).



## Ségrégation des allèles

Pour chaque lignée, 73 à 1202 graines provenant de 2 à 8 plantes ont été placées sur milieu de germination (Simoens *et al.* 1988) contenant de la kanamycine (50 mg/l). Les plantules résistantes à la kanamycine et les plantules sensibles à la kanamycine ont été dénombrées une à deux semaines après la germination.

## Analyse cytogénétique de la méiose

Le déroulement de la méiose chez les microsporocytes a été analysé pour des plants de la lignée 5368 homozygotes pour l'insertion dans le gène *AtPMS1* (*AtPMS1::T-DNA*) ou homozygotes pour l'allèle normal du gène *AtPMS1*. Les chromosomes méiotiques ont été obtenus selon une adaptation du protocole de Veira *et al.* (1990). Les bouquets floraux de tiges émergentes (environ 1 cm) de plants traités au froid (une nuit à 4 °C) ont été coupés et fixés au moins 12 heures dans une solution 25 % acide acétique : 75 % éthanol, puis gardés dans de l'éthanol 70 %. Les bourgeons ont été réhydratés dans une série de bains d'éthanol / eau juste avant d'être disséqués dans une goutte d'eau sous une loupe binoculaire. Les anthères au stade approprié ont été transférées sur une lame en évitant la dessiccation.

Les étalements de chromosome ont été réalisés par écrasement (« squash ») des anthères entre lame et lamelle dans un milieu de montage et de coloration (glycérol 50 %, tampon Tris 0,1 M pH 9, DAPI 0,1-1 µg/ml, PPD 1 mg/ml). Les méioses ont été observées au microscope à épifluorescence et photographiées avec un appareil photo numérique à l'aide du logiciel Isis (de MetaSystems, Altlußheim, Allemagne). Des séries de photographies ont été prises manuellement dans différents plans focaux et reconstituées en une seule image par superposition manuelle à l'aide du logiciel de traitement d'image Adobe Photoshop 4.0 (de Adobe Systems, San Jose, USA).

Seules les méioses où les chromosomes individuels pouvaient être comptés avec confiance ont été considérées lors des analyses. Un nombre minimal de figures correspondant à chacun des stades de la méiose ont été recherchées et photographiées.

## RÉSULTATS

Le principal objectif de ce travail était d'investiguer les conséquences phénotypiques résultant de l'inactivation du gène *AtPMS1*, un homologue du gène bactérien *MutL* chez *Arabidopsis thaliana*. Pour ce faire, nous avons fait appel à des mutants insertionnels contenant un T-DNA inséré dans le gène *AtPMS1*. Une telle insertion entraîne, en théorie, une inactivation complète du gène en question et permet d'en étudier les conséquences.

Au moment d'amorcer ce projet, un étudiant du laboratoire (E. Dion) avait identifié deux lignées portant chacune un T-DNA dans le gène *AtPMS1* (lignées 4706 et 5368). La figure 6 montre l'emplacement de ces T-DNA au sein du gène *AtPMS1* (E. Dion, communication personnelle). Dans le cas de la lignée 4706, l'insertion s'est produite au milieu du gène, vers la fin du deuxième exon (à ~2 kb à l'intérieur du gène). Chez la lignée 5368, l'insertion a eu lieu au tout début du gène (à ~300 pb), à même le premier exon. Des analyses RT-PCR ont montré que ces insertions résultaient en l'abolition de l'ARNm normal de ce gène (E. Dion; communication personnelle). Il devenait donc possible d'examiner les conséquences phénotypiques d'une telle inactivation. En raison des observations faites chez d'autres eucaryotes (voir la revue de littérature), notre attention s'est tournée vers les conséquences de la mutation sur 1) la morphologie et la fécondité de ces plantes, et 2) le déroulement de la méiose chez ces mutants.

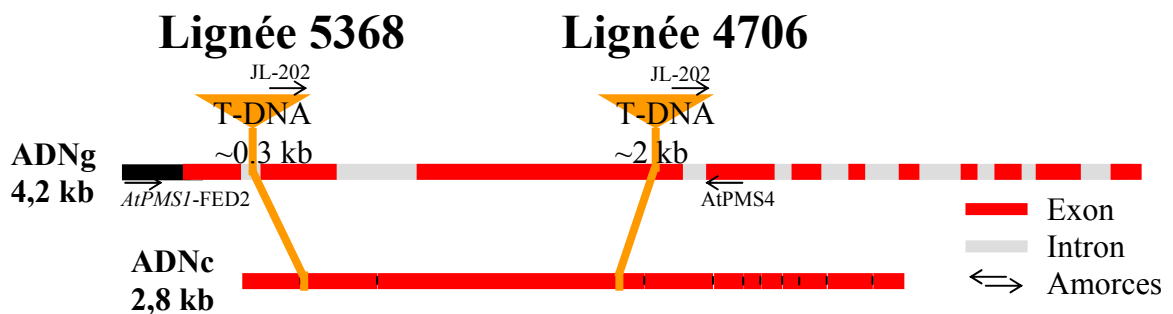


Figure 6 : Représentation schématique du gène *AtPMS1* et de la position des insertions du T-DNA chez les deux lignées étudiées. Selon E. Dion, Université Laval.

Comme les allèles mutants (*AtPMS1::T-DNA*) ont été isolés à l'état hétérozygote, il a été nécessaire de produire des lignées homozygotes pour chacune des deux mutations insertionnelles. Suite à une autofécondation, trois génotypes ont été obtenus pour chacune des deux lignées à l'étude : homozygote sauvage (*AtPMS1/AtPMS1*), hétérozygote (*AtPMS1/AtPMS1::T-DNA*) et homozygote mutant (*AtPMS1::T-DNA/AtPMS1::T-DNA*). Des amplifications PCR, à l'aide de trois amorces spécifiques dont l'emplacement approximatif est illustré à la figure 6, ont été employées pour déterminer le génotype des divers descendants pour chacune des deux lignées porteuses d'une insertion dans le gène *AtPMS1*. Comme on peut le voir dans l'exemple illustré à la figure 7 pour la descendance de la lignée 4706, l'amplification produit trois profils distincts. Chez l'homozygote sauvage, une seule bande (~2,5 kb) est obtenue. Chez l'homozygote mutant, un amplicon de ~220 pb ou ~2 kb (allèle mutant chez les lignées 4706 et 5368 respectivement) est observé. Finalement, chez l'hétérozygote, deux bandes de 2,5 kb (allèle sauvage) et ~220 pb ou ~2 kb (allèle mutant) sont présentes. Diverses analyses phénotypiques ont été réalisées sur ces lignées mutantes et les résultats de ces caractérisations seront présentés séparément pour les deux lignées.

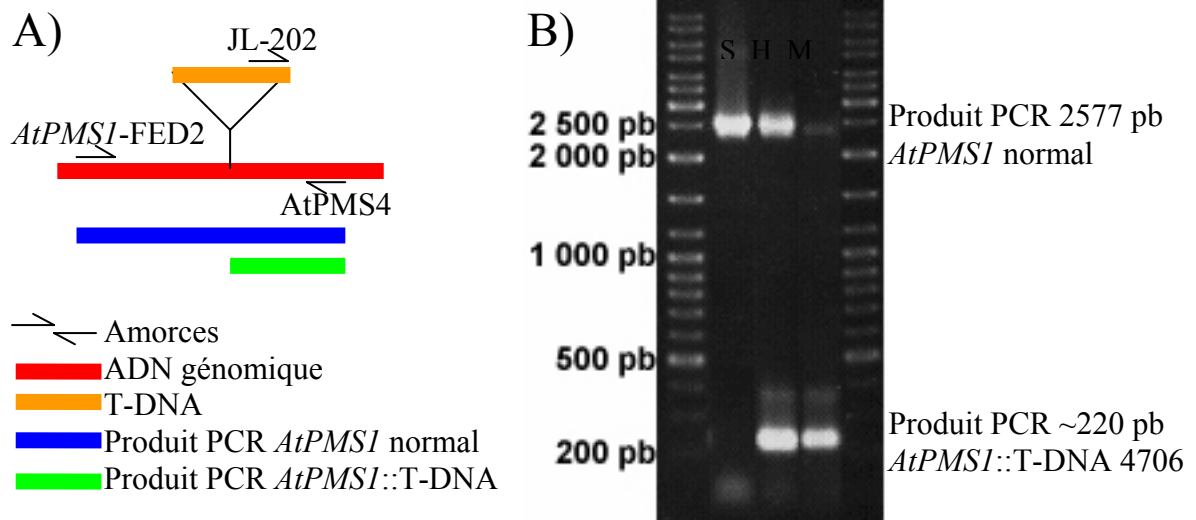


Figure 7 : Génotypage des lignées.

A) Schéma des amorces utilisées et des produits d'amplification.

B) Photo d'un gel d'agarose obtenu lors du génotypage de plants de la lignée 4706 (S = sauvage, H = hétérozygote, M = mutant).

## **Caractérisation de la lignée 4706**

### **Morphologie des plants**

Les plants homozygotes sauvages ou hétérozygotes de la lignée 4706 ne montraient aucune anomalie phénotypique frappante. Par contre, les homozygotes pour l'allèle mutant présentaient une morphologie anormale caractérisée par un port buissonnant, un phénotype souvent rencontré chez les plantes stériles. Les siliques observées chez les mutants varient de presque normales (~1 cm) à très petites (~1 mm), ces dernières ne contenant pas de graines. Les longues siliques sont observées uniquement en début de floraison chez les plantes avec un phénotype moins marqué. Chez la plupart des mutants, les siliques ont une taille de 1 à 5 mm. Chez les mutants avec un phénotype prononcé, toutes les siliques sont très petites (1-2 mm) et sans graines. De plus, l'extrémité des hampes florales des mutants a une apparence anormale avec des pétales très petits ou non-visibles lors d'une observation rapide.

Suite à l'examen des fleurs, des anomalies au niveau des pétales et des étamines ont été notées (figure 8). Ces anomalies sont assez constantes chez les mutants avec un phénotype fort. Cependant, la sévérité des anomalies varie chez les mutants avec un phénotype plus faible : les fleurs sont d'abord quasi normales puis deviennent progressivement aussi affectées que celles des mutants forts. Chez ces derniers, les pétales ont une apparence sépaloïde : courts (longueur similaire aux sépales), légèrement concaves et de couleur verdâtre. Les étamines montrent des anomalies importantes et variées à tendance carpelloïde : anthères vertes, difformes ou absentes avec présence occasionnelle d'ovaires à nu ou de papilles stigmatiques. Les étamines anormales ne produisent pas de pollen, ce qui pourrait expliquer la baisse de fécondité.

La sévérité des anomalies observées s'accroît généralement avec l'âge des plantes : les premières fleurs ont des pétales et produisent des siliques contenant des graines. La taille des pétales et des siliques diminue par la suite pour atteindre des pétales non visibles et des siliques vides (sans graines) pour les fleurs tardives. Les modifications phénotypiques s'accroissent donc notablement avec l'avancement des générations. Plusieurs plants

homozygotes de la première génération avaient une morphologie (et une fécondité) pratiquement normale, mais leur progéniture présente des anomalies plus prononcées.

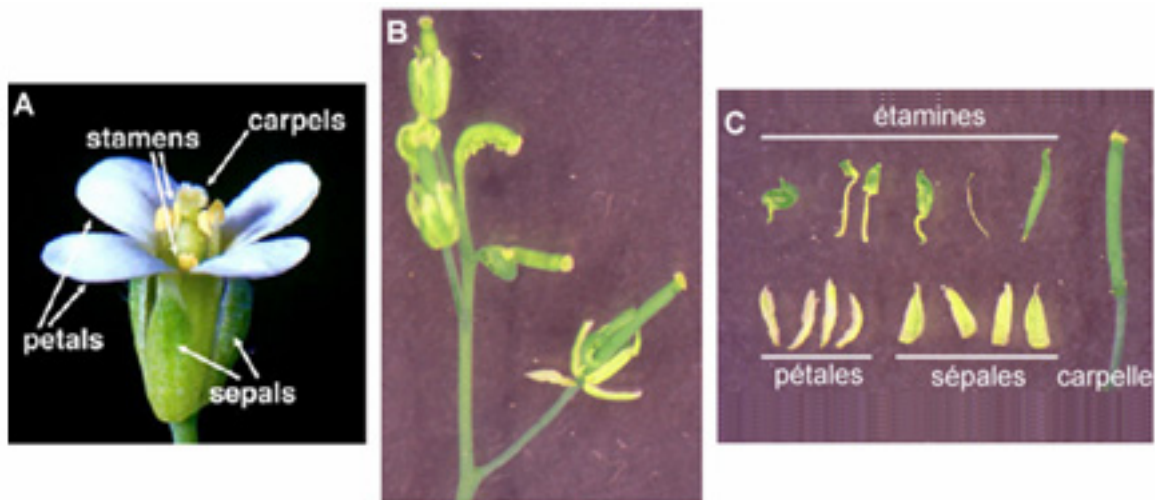


Figure 8 : Morphologies anormales des fleurs de la lignée 4706.

- A) Une fleur normale d'*Arabidopsis thaliana*. (photo tirée du site TAIR).
- B) Extrémité d'une tige tardive d'un plant mutant de la lignée 4706.
- C) Dissection d'une fleur tardive d'un plant mutant de la lignée 4706.

### Fécondité

La production de graines de la lignée mutante 4706 a été évaluée à deux reprises en variant les conditions de culture (cabinet de croissance ou salle de culture). Les résultats obtenus avec la lignée 4706 lors des deux mesures de fécondité sont rapportés au tableau 5. Dans le premier essai (salle de culture, récolte de toutes les siliques sur la tige principale), les plants de type sauvage ont produit en moyenne 13,3 graines/silique alors que chez les mutants, cette production était significativement réduite à seulement 1,8 graines par silique. Comme la production de graines chez les plantes sauvages était inférieure à celle attendue (~40-60 graines/silique), un second essai a été réalisé en cabinet de croissance pour améliorer les conditions de croissance. Aussi, seules les dix premières siliques de la tige principale ont été récoltées pour standardiser l'échantillon analysé. Encore une fois, une différence significative a été observée avec une production de 18,9 graines par silique pour les plants sauvages et seulement 1,1 graines/silique pour les plants mutants. Pour ces deux essais, la fécondité des mutants atteignait 14 % et 5,8 % de celle observée chez le type sauvage.

Tableau 5 : Fécondité de la lignée 4706.

		<i>AtPMS1/AtPMS1</i>	<i>AtPMS1::T-DNA/AtPMS1::T-DNA</i>
Essai 1 <sup>A</sup> (graines/sil)	moyenne (écart-type) nombre de siliques	13.3 (11.5) 35	1.8 (6.4)* 145
Essai 2 (graines/sil)	moyenne (écart-type) nombre de plants	18.9 (10.1) 12	1.1 (1.6)* 14

<sup>A</sup> Valeurs pour toutes les siliques.

\* Différence significative ( $\alpha < 0,05$ ).

### Ségrégation des allèles

Pour vérifier si l'allèle mutant est transmis à la même fréquence que l'allèle sauvage, les graines produites par des plantes hétérozygotes ont été mises à germer en présence d'un agent de sélection (kanamycine). Parmi la descendance, les plantes ne possédant pas au moins un exemplaire du T-DNA (les homozygotes sauvages) sont sensibles et blanchissent. Tel qu'attendu, environ 3/4 (588/792 ; 74,2 %) des plantes sont demeurées vertes (résistantes), alors qu'un quart (204/792 ; 25,8 %) sont devenues blanches (sensibles). On peut donc conclure à une ségrégation mendélienne des deux allèles et à la présence probable d'un seul site d'insertion du T-DNA chez le mutant 4706.

### Résumé de la caractérisation de la lignée 4706

En résumé, l'allèle mutant de la lignée 4706 cause un phénotype marqué avec une importante baisse de fécondité qui semble provenir d'anomalies dans la morphologie florale. Deux verticilles de la fleur sont particulièrement touchés : les pétales et les étamines. Par contre, la ségrégation de l'allèle mutant est normale. Comme nous le verrons dans la discussion, tout laisse croire que le phénotype observé est causé par le « contenu » du T-DNA plutôt que de son insertion dans le gène *AtPMS1*.

## Caractérisation de la lignée 5368

### Morphologie des plants

Les plants homozygotes sauvages ou hétérozygotes de la lignée 5368 ne montrent aucune anomalie phénotypique frappante. Les plants homozygotes pour l'allèle mutant de la lignée 5368 ont une apparence normale pour ce qui est de la rosette, des hampes florales et du port général. Cependant les siliques sont un peu plus courtes que la normale, mesurant moins de 7 mm. Contrairement à ce qui a été décrit précédemment pour les mutants de la lignée 4706, les fleurs des mutants de la lignée 5368 ont une morphologie normale avec présence de pollen sur les étamines.

### Fécondité

La production de graines de la lignée mutante 5368 a été évaluée à deux reprises en variant les conditions de culture (cabinet de croissance ou salle de culture). Les résultats obtenus avec la lignée 5368 lors des deux mesures de fécondité sont rapportés au tableau 6. Lors du premier essai (salle de culture, récolte de toutes les siliques sur la tige principale) et du deuxième essai (cabinet de croissance, récolte des 10 premières siliques), les plants de type sauvage ont produit en moyenne 15,3 et 17,8 graines par silique alors que chez les mutants, cette production était significativement réduite ( $\alpha < 0.05$ ), atteignant seulement 3,4 et 3,9 graines par silique. Pour ces deux essais, la fécondité des mutants de la lignée 5368 atteignait 33 % et 22 % de celle observée chez le type sauvage.

Tableau 6 : Fertilité de la lignée 5368.

		<i>AtPMS1/AtPMS1</i>	<i>AtPMS1::T-DNA/AtPMS1::T-DNA</i>
Essai 1 <sup>A</sup> (graines/sil)	moyenne (écart-type)	15.3 (12.0)	5.1 (3.4)*
	nombre de siliques	27	41
Essai 2 (graines/sil)	moyenne (écart-type)	17.8 (17.8)	3.9 (3.7)*
	nombre de plants	2	10

<sup>A</sup> Valeurs pour les siliques avec graines.

\* Différence significative ( $\alpha < 0,05$ ).

### **Ségrégation des allèles**

Pour vérifier si l'allèle mutant est transmis à la même fréquence que l'allèle sauvage, les graines produites par des plantes hétérozygotes de la lignée 5368 ont été mises à germer en présence de kanamycine. Contrairement à la situation observée chez la lignée 4706, seulement 39 % (258/661) des plantes sont demeurées vertes (résistantes), alors que 61 % (403/661) sont devenues blanches (sensibles). Ces valeurs dévient significativement du ratio résistant:sensible attendu de 3:1 ( $\chi^2 = 456.1$ ;  $\alpha \ll 0.01$ ). La ségrégation de l'allèle mutant *AtPMS1::T-DNA* 5368 ne semble donc pas mendélienne avec un ratio phénotypique de ségrégation résistant:sensible d'environ 2:3.

### **Résumé de la caractérisation de la lignée 5368**

En résumé, le mutant insertionnel de la lignée 5368 montre un phénotype légèrement différent de la normale. La morphologie des plants et des fleurs est essentiellement normale avec des siliques de taille diminuée comme seule particularité. La fécondité est diminuée (22 % à 33 % de la fécondité sauvage) et un fort biais de ségrégation défavorise la transmission de l'allèle mutant à la descendance des plants hétérozygotes. En raison de la baisse de fécondité et de la transmission anormale des allèles avec une morphologie florale normale, il nous a semblé utile d'examiner la méiose chez cette lignée.

### **Méiose des microsporocytes de la lignée 5368**

#### **Observations cytogénétiques chez *Arabidopsis thaliana***

Lors des essais des préparations cytogénétiques des méioses des microsporocytes, plusieurs éléments critiques pour l'obtention de préparations adéquates ont pu être identifiés. Les premiers éléments critiques concernent la sélection des bourgeons et des anthères appropriés pour observer des cellules en division méiotique. L'utilisation de tiges émergentes combiné au traitement au froid tels que décrit par Veira *et al.* (1990) a permis d'obtenir des méioses dans au moins un des bourgeons de presque tous les bouquets



floraux. La sélection du stade correct des bourgeons a été faite suite à la dissection en série des bourgeons de plusieurs bouquets floraux. Ces dissections en série ont permis d'identifier les bourgeons au stade approprié chez l'écotype *Ws*. Chez cet écotype, la méiose se produit généralement dans les 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> bourgeons avant l'apparition de la coloration jaune des anthères.

Un autre élément critique concerne la manutention des anthères. Pour obtenir des préparations utilisables, il est essentiel d'éviter la dessiccation. En effet, les anthères qui sèchent deviennent trop dures pour être étalées par écrasement. Il a donc été nécessaire de réaliser les dissections dans une goutte d'eau et d'ajuster le milieu de montage en diminuant la proportion de glycérol qui est normalement utilisé en cytogénétique (90 %). Il aurait probablement été possible d'améliorer encore la préparation des anthères pour optimiser les étalements, mais les conditions que nous avons utilisées étaient suffisantes pour obtenir des préparations intéressantes.

L'utilisation du colorant DAPI, qui est maintenant couramment utilisé pour la cytogénétique d'*A. thaliana*, a permis d'obtenir un contraste très satisfaisant et de réaliser une observation relativement aisée des chromosomes méiotiques. Malgré cela, les chromosomes étaient trop petits pour un comptage directement au microscope. Nous avons donc réalisé des photographies afin de faciliter les comptages. Cependant, comme les écrasements produisent des préparations épaisses, il a été nécessaire de faire des séries de photo à différents plans focaux. Malheureusement, les microscopes auxquels nous avons un accès facile ne permettaient pas de reconstituer une image 3D avec une coloration au DAPI. Le microscope confocal du pavillon Charles-Eugène Marchand ne comprenait pas de laser compatible avec le DAPI et les microscopes à épifluorescence auxquels nous avons accès ne possédaient pas de logiciel permettant la construction d'image à profondeur étendue. Nous avons pu contourner ce problème en reconstituant manuellement les images à partir des séries photo dans différents plans. Cette approche a demandé plus de temps d'analyse mais a fourni des résultats similaires à ce que peuvent accomplir les logiciels qui sont maintenant disponibles pour reconstruire des images à profondeur étendue à partir d'une série de photos en épifluorescence.

### **Observations cytogénétiques chez *Arabidopsis thaliana***

Lors des essais des préparations cytogénétiques des méioses des microsporocytes, plusieurs éléments critiques pour l'obtention de préparations adéquates ont pu être identifiés. Les premiers éléments critiques concernent la sélection des bourgeons et des anthères appropriés pour observer des cellules en division méiotique. L'utilisation de tige émergentes combiné au traitement au froid tels que décrit par Veira *et al.* a permis d'obtenir des méioses dans au moins un des bourgeons de presque tous les bouquets floraux. La sélection du stade correct des bourgeons a été faite suite à la dissection en série des bourgeons de plusieurs bouquets floraux. Ces dissections en série ont permis d'identifier les bourgeons au stade approprié chez l'écotype Ws. Chez cet écotype, la méiose se produit généralement dans les 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> bourgeons avant l'apparition de la coloration jaune des anthères.

Un autre élément critique concerne la manutention des anthères. Pour obtenir des préparations utilisables, il est essentiel d'éviter la dessiccation. En effet, les anthères qui sèchent deviennent trop dur pour être étalé par écrasement. Il a donc été nécessaire de réaliser les dissections dans une goutte d'eau et d'ajuster le milieu de montage en diminuant la proportion de glycérol qui est normalement utilisé en cytogénétique (90%). Il aurait probablement été possible d'améliorer encore la préparation des anthères pour optimiser les étalements, mais les conditions que nous avons utilisées étaient suffisantes pour obtenir des préparations intéressantes.

L'utilisation du colorant DAPI, qui est maintenant couramment utilisé pour la cytogénétique d'*A. thaliana*, a permis d'obtenir un contraste très satisfaisant et de réaliser une observation relativement aisée des chromosomes méiotique. Malgré cela, les chromosomes étaient trop petits pour un comptage directement au microscope. Nous avons donc réalisé des photographies afin de faciliter les comptages. Cependant, comme les écrasements produisent des préparations épaisses, il a été nécessaire de faire des séries de photo à différents plans focaux. Malheureusement, les microscopes auxquels nous avons

un accès facile ne permettaient pas de reconstituer une image 3D avec une coloration au DAPI. Le microscope confocal du pavillon Charles-Eugène Marchand ne comprenait pas de laser compatible avec le DAPI et les microscopes à épifluorescence auxquels nous avons accès ne possédaient pas de logiciel permettant la construction d'image à profondeur étendu. Nous avons pu contourner ce problème en reconstituant manuellement les images à partir des séries photo dans différents plans. Cette approche a demandé plus de temps d'analyse mais a fourni des résultats similaires à ce que peuvent accomplir les logiciels qui sont maintenant disponibles pour reconstruire des images à profondeur étendu à partir d'une série de photo en épifluorescence.

### **Déroulement normal de la méiose chez *Arabidopsis thaliana***

Les préparations obtenues à partir des anthères de plants normaux pour *AtPMS1* provenant de la lignée 5368 ont permis l'observation de toutes les étapes tardives de la méiose allant de la fin de la prophase I jusqu'à la formation des tétrades (voir figures 9 et 10). Les chromosomes méiotiques d'*Arabidopsis thaliana* deviennent clairement discernables au microscope à épifluorescence au stade de la diacycnèse en prophase I (fig. 9 A-C). À ce stade, les chromosomes bivalents se condensent et les chiasmas maintiennent la cohésion entre les homologues. On peut parfois voir les chiasmas (fig. 9 B) mais la petite taille des chromosomes d'*A. thaliana* rend les observations incertaines dans ce genre de préparations. Lors de la métaphase I, les chromosomes s'alignent sur le plan équatorial (fig. 9 D-E). Les homologues sont séparés et tirés vers les deux pôles lors de l'anaphase I (fig. 9 F) pour former deux groupes de 5 chromosomes univalents composés de deux chromatides soeurs (fig. 9 G-H). La télophase I d'*A. thaliana* ne comporte pas de reformation de la membrane nucléaire et de cytokynèse. La télophase I (fig. 9 I) et la prophase II (fig. 10 A) sont continues. Le seul changement observable du passage vers la prophase II est le regroupement d'organites contenant de l'ADN (plastides et mitochondries) aux environs du plan équatorial de la métaphase I. À la métaphase II (fig. 10 B), les deux groupes de cinq chromosomes s'alignent sur deux nouvelles plaques méiotiques. Ces plaques sont grossièrement perpendiculaires au plan équatorial de la métaphase I et l'angle entre les deux plaques de la métaphase II est variable (plans parallèles, perpendiculaires ou

intermédiaires). Lors de l'anaphase II (fig. 10 C-D), les chromatides soeurs sont séparées pour former quatre groupes distincts de cinq chromosomes univalents composés d'une seule chromatide. Pendant la télophase II (fig. 10 E-H), des membranes nucléaires se forment autour des quatre groupes de chromosomes qui se décondensent partiellement. La cellule se scinde ensuite en quatre cellules filles qui forment une tétrade (fig. 10 I).

Légende figure 9 (page suivante) : Déroulement normal de la méiose chez *Arabidopsis thaliana* : stades prophase I à anaphase I.

- A -C) Prophase I tardive : les chromosomes homologues appariés se condensent. Un chiasma probable est indiqué par une flèche
- D) Fin prophase I / début métaphase I: les chromosomes s'alignent sur la plaque méiotique.
- E) Métaphase I : les chromosomes sont alignés sur la plaque méiotique.
- F) Anaphase I : les chromosomes homologues se séparent.
- G-H) Anaphase I tardive / télophase I précoce (vue polaire) : les chromosomes homologues migrent vers les pôles opposés de l'androsporocyte.
- I) Télophase I : deux groupes distincts de 5 chromosomes bivalents sont bien visibles dans l'androsporocyte.

Trait  $\approx 1 \mu\text{m}$ .

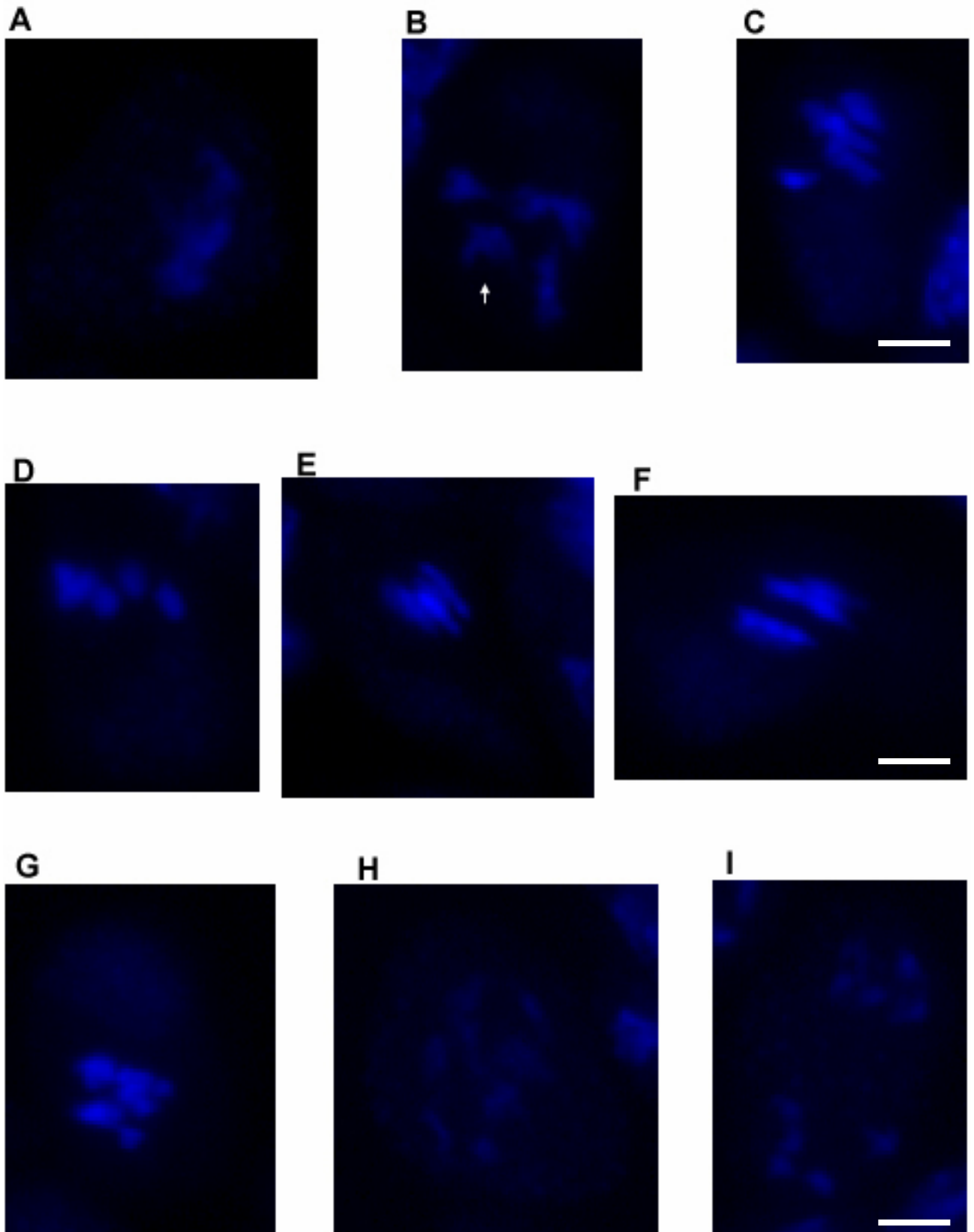


Figure 9 : Déroulement normal de la méiose chez *A. thaliana* : stades prophase I à anaphase I.

Trait  $\approx 1 \mu\text{m}$

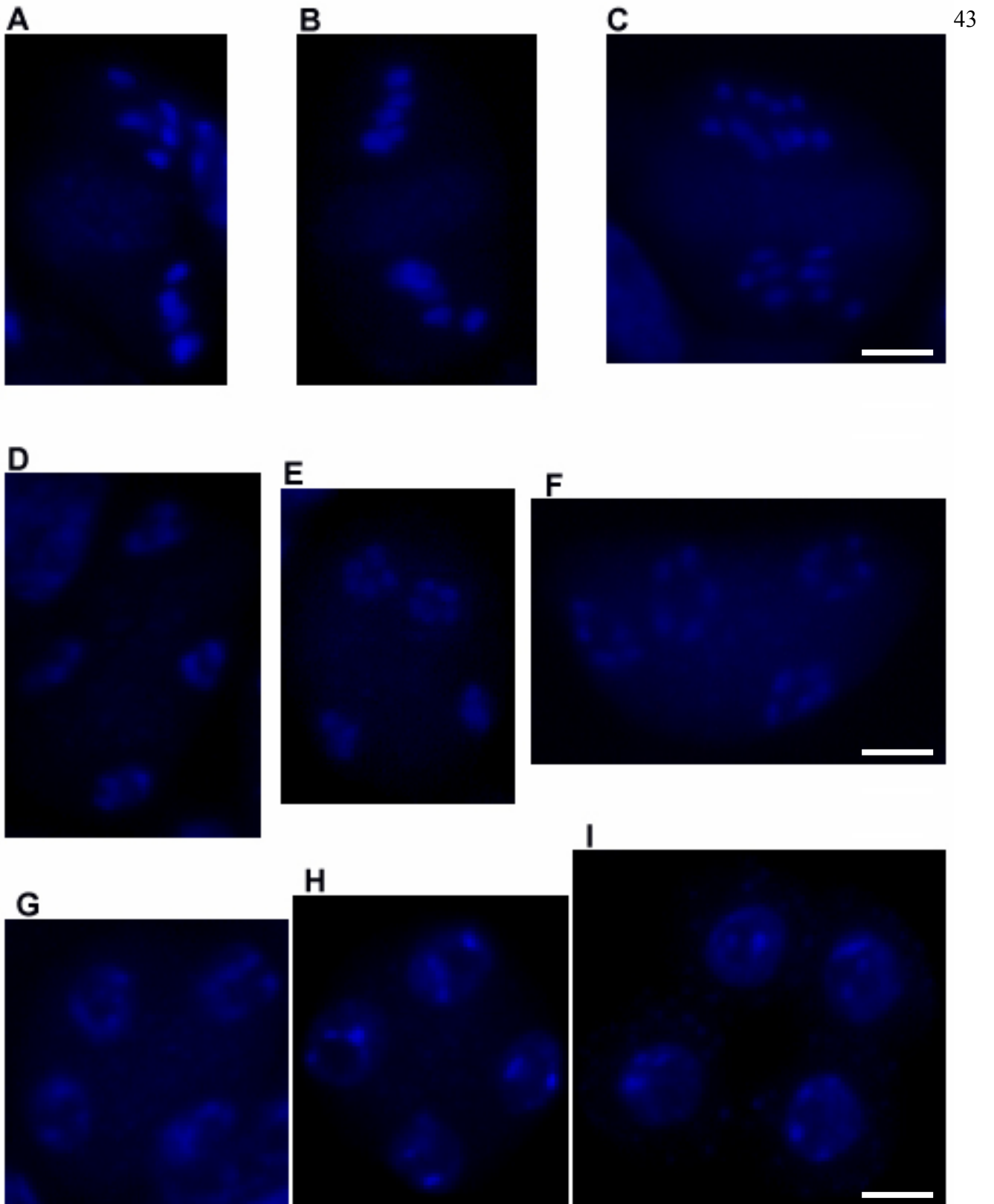


Figure 10 : Déroulement normal de la méiose chez *A. thaliana* : stades prophase II à tétrade.

Trait  $\approx 1 \mu\text{m}$

Légende figure 10 (page précédente) : Déroulement normal de la méiose chez *A. thaliana* : stades prophase II à tétrade.

- A) Prophase II : chaque groupe de chromosomes s'aligne sur la seconde plaque méiotique. Notez la présence d'un nuage d'organelles entre les deux groupes de chromosomes.
- B) Métaphase II : les chromosomes sont regroupés sur les deux plaques méiotiques.
- C-D) Anaphase II : les chromatides soeurs se séparent et s'éloignent.
- E) Anaphase II tardive / télophase II précoce : les chromosomes simples s'éloignent.
- F) Télophase II : les quatre groupes de cinq chromosomes composés chacun d'une chromatide sont bien séparés.
- G-H) Télophase II tardive : les membranes nucléaires se reforment autour de chaque groupe de chromosomes qui se décondensent progressivement par la suite.
- I) Tétrade : la cellule mère pollinique (PMC) a été divisée en quatre cellules haploïdes qui devraient donner naissance à quatre grains de pollen.

Les observations de la méiose des microsporocytes chez les plants normaux ont permis de déterminer que le taux d'anomalies spontanées de la méiose chez *Arabidopsis thaliana* est assez bas (< 5 %) (voir tableau 7). Seulement deux figures méiotiques anormales ont été notées sur 83 observations : une méiose au stade prophase I montrait un fragment de chromosome et une méiose au stade télophase II montrait une partition inégale des chromosomes (5 + 5 + 6 + 4).

Tableau 7 : Résumé des observations cytogénétiques chez *A. thaliana* de type sauvage WS.

	Figures méiotiques	
	Normales	Anormales
Prophase I à Métaphase I	28	1 (3.4%)
Anaphase I à Métaphase II	33	0
Anaphase II à Tétrade	20	1 (4.8%)
Total	81	2 (2.4%)

### **Anomalies de la méiose chez les microsporocytes de la lignée 5368**

Tout comme cela avait été possible pour les plants normaux, les préparations obtenues à partir des anthères des plants mutants pour *AtPMS1* (*AtPMS1::T-DNA*) provenant de la lignée 5368 ont permis l'observation de toutes les étapes tardives de la méiose allant de la

fin de la prophase I jusqu'à la formation de tétrades. Ces observations démontrent clairement que le déroulement complet de la méiose est possible chez les mutants *AtPMS1::T-DNA*. Cependant, plus de 16 % des figures méiotiques observées présentent des anomalies plus ou moins importantes (voir tableau 8). Ceci représente une augmentation significative par rapport à la lignée normale ( $\chi^2 = 37.73$ ). De plus, la fréquence des anomalies augmente significativement suite à la métaphase I, passant de 8 % à environ 20 %.

Tableau 8 : Résumé des observations cytogénétiques chez la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA*.

	Figures méiotiques		$\chi^2$ (vs WT)
	Normales	Anormales	
Prophase I à Métaphase I	34	3 (8.1%)	2.33
Anaphase I à Métaphase II	24	6 (20 %)	25.86* <sup>A</sup>
Anaphase II à Tétrade	13	3 (19 %)	6.90*
Total	71	12 (14 %)	26.20*

\*  $\chi^2$  significatif à  $\alpha < 0.01$  ( $v=1$ ).

<sup>A</sup>  $\chi^2$  approché : calculé avec une fréquence théorique d'anomalies de 1/30 méioses.

Les figures méiotiques anormales observées chez les plants mutants sont présentées à la figure 12 pour les stades prophase I à métaphase II et à la figure 11 pour les stades anaphase II à tétrade. Deux types d'anomalies ont été observées : la présence de fragments de chromosomes et une ségrégation défectueuse des chromosomes. La distribution des anomalies entre les différents stades est résumée au tableau 9. Après la métaphase I, les anomalies semblaient constantes dans leur fréquence et leur distribution ( $\chi^2$  non significatif pour toutes les comparaisons).

En résumé, l'analyse cytogénétique de la méiose des microsporocytes de la lignée *AtPMS1::T-DNA* 5368 a mis en évidence une augmentation de 2 à 5 fois des anomalies de fragmentation des chromosomes et de ségrégation des chromosomes. Cependant, la majorité des cellules (84 %) réussissaient à compléter une méiose normale.



Tableau 9 : Distribution des anomalies cytogénétiques observées.

Anomalies	Prophase I à Métaphase I	Anaphase I à Métaphase II	Anaphase II à Tétrade	Total
Fragments <sup>A</sup>	3	3	1	7 / 8.4 %
Ségrégation <sup>B</sup>	-	3	1	4 / 4.8 %
Multiples <sup>C</sup>	-	-	1	1 / 1.2 %
total	3 (8,1 %)	6 (20 %)	3 (19 %)	12 / 14.4 %

A Fragments de chromosomes.

B Ségrégation déficiente des chromosomes : ségrégation inégale des chromosomes (ex. : 6 + 4), chromosomes retardataires ou extra-nucléaires.

C Fragments de chromosomes et ségrégation déficiente.

D Figure méiotique avec un second type d'anomalie.

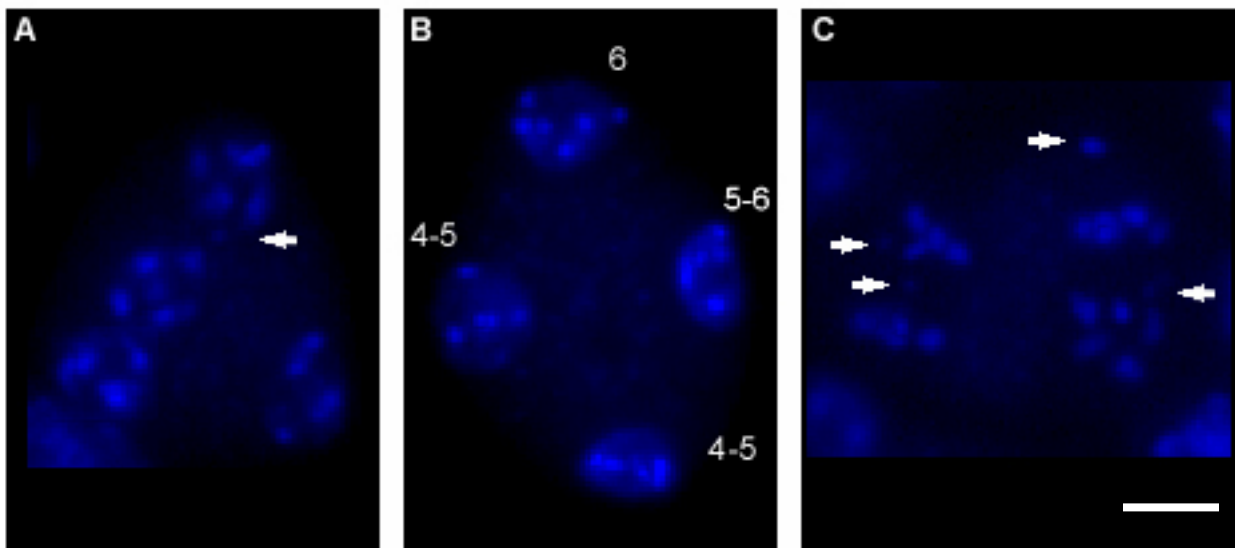


Figure 11 : Figures méiotiques anormales observées chez des plants de la lignée mutante 5368 *AtPMS1::T-DNA* : stades anaphase II à tétrade.

Trait  $\approx 1 \mu\text{m}$ .

A) Stade télophase II avec fragment de chromosome.

B) Stade télophase II avec ségrégation déficiente des chromosomes.

C) Stade anaphase II tardive avec fragments de chromosome et ségrégation déficiente des chromosomes (chromosome extra-nucléaire).

Les fragments et le chromosome extra-nucléaire sont indiqués par des flèches.

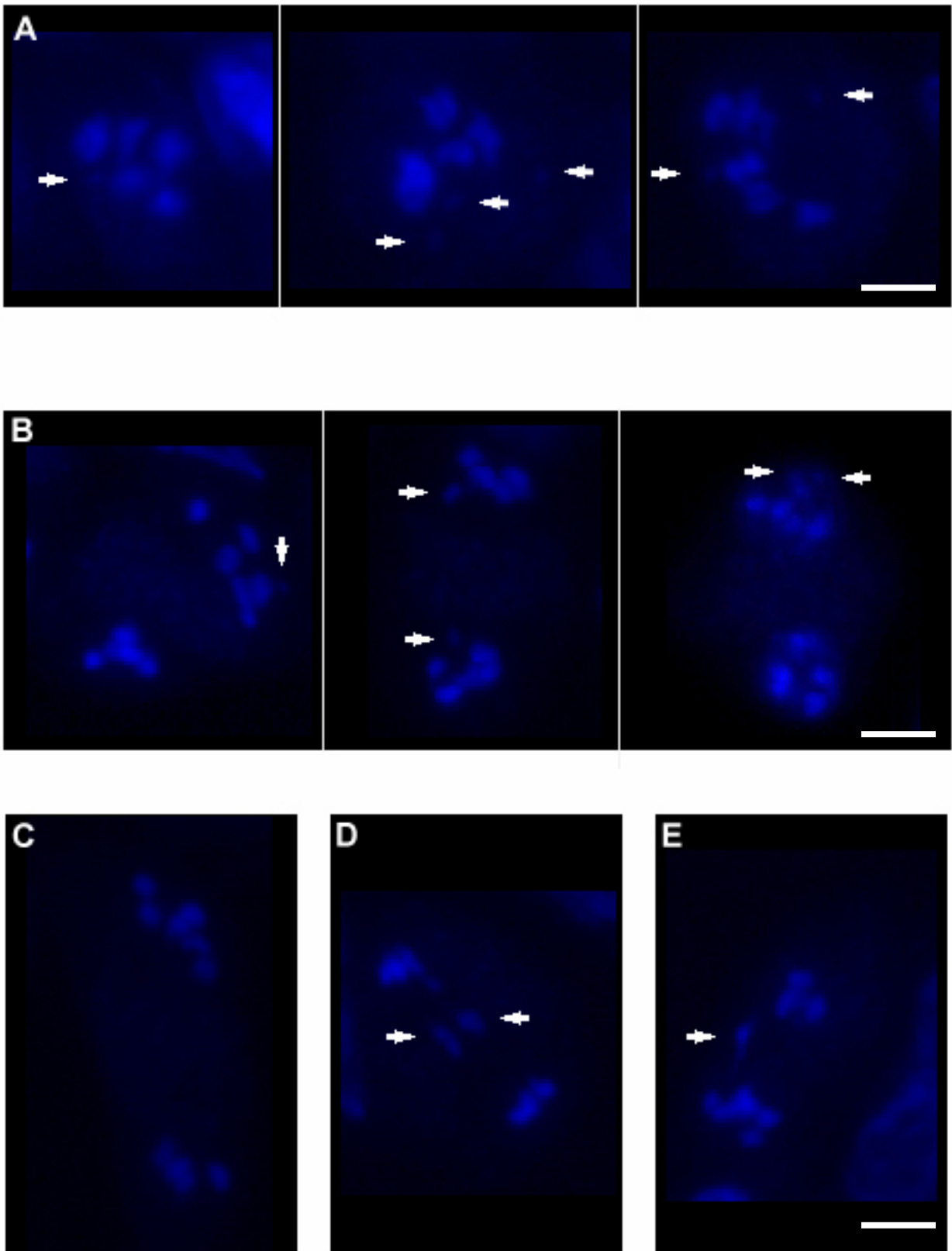


Figure 12 : Figures méiotiques anormales observées chez des plants de la lignée mutante 5368 AtPMS1::T-DNA : stades prophase I à prophase II.

Traits  $\approx 1\mu\text{m}$ .

Légende figure 12 (page précédente) : Figures méiotiques anormales observées chez des plants de la lignée mutantes 5368 *AtPMS1::T-DNA* : stades prophase I à prophase II.

- A) Stade prophase I avec fragments de chromosome.
- B) Stade prophase II avec fragments de chromosome.
- C) Stade prophase II avec partition inégale des chromosomes (6 en haut et 4 en bas).
- D) Stade anaphase I / télophase I avec ségrégation défectueuse des chromosomes (2 'retardataires' entre les deux groupes de chromosomes).
- E) Stade anaphase I / télophase I avec une partition inégale et une ségrégation défectueuse des chromosomes (6 dans le bas, 1 au centre, 3 dans le haut)

Les flèches indiquent les fragments de chromosomes et les chromosomes retardataires.

# DISCUSSION

## Phénotype de la lignée 4706 : un cas de cosuppression

Les anomalies très sévères observées au niveau des organes floraux de la lignée *AtPMS1::T-DNA* 4706 étaient inattendues étant donné les fonctions connues pour PMS1 chez d'autres organismes. De plus, le phénotype de la lignée *AtPMS1::T-DNA* 5368 était très différent de celui de la lignée 4706. Il y avait donc de fortes chances pour que le phénotype de l'un des deux mutants soit causé par autre chose que l'inactivation d'*AtPMS1*.

Le suivi des plants de ces deux lignées sur plusieurs générations (Eric Dion, communication personnelle) concordait avec la présence d'un seul site d'insertion de T-DNA et indiquait l'association de la présence du T-DNA avec les phénotypes morphologiques observés. Nous nous sommes alors posés des questions quant à savoir si quelque chose au niveau de la séquence du T-DNA utilisé pouvait être en cause.

Le T-DNA de 5 938 pb inséré dans le génome végétal des lignées mutantes 4706 et 5368 contient le promoteur du gène *APETALA3* d'*A. thaliana* ainsi que les gènes *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) et *NPTII* (résistance à la kanamycine) (Krysan *et al.* 1999, Krysan *et al.* 1996, AKF ressource Internet). Les gènes *GUS* et *NPTII* sont couramment utilisés en transgénèse végétale comme gènes rapporteur et de sélection respectivement. *APETALA3* (*AP3*) est un gène homéotique floral qui code pour une protéine à domaine MADS (homologue au facteur de transcription SRF) et qui sert à la spécification de l'identité des étamines et des pétales (TAIR, ressource Internet). Le phénotype *ap3* amène une conversion homéotique des pétales en sépales et des étamines en carpelles.

Le phénotype du premier allèle mutant décrit, *ap3-1* (Bowman *et al.* 1989), inclut des pétales transformés en sépales légèrement plus petits que la normale et des étamines variables. Les étamines peuvent être normales, transformées en des carpelles non fusionnés (avec ovules normaux mais à nu et ornés de papilles stigmatiques) ou avoir des caractéristiques intermédiaires plus ou moins carpelloïdes. La sévérité des anomalies des

étamines augmente avec l'âge des inflorescences. Les étamines latérales sont moins affectées.

Les anomalies des pétales et des étamines des plants *ap3-1* correspondent bien à celles observées chez les plants *AtPMS1::T-DNA* de la lignée 4706 : des pétales sépaloïdes, des étamines plus ou moins carpelloïdes et une augmentation de la sévérité des anomalies avec l'âge des inflorescences. Le phénotype observé correspondant à *ap3* et la présence du promoteur AP3 dans le T-DNA suggère fortement une situation de cosuppression du gène *AP3*. La cosuppression est un phénomène observé en transgénèse végétale. La cosuppression est un mécanisme probablement causé par un système de défense contre l'invasion de séquences exogènes d'ADN et d'ARN. Dans la réaction de cosuppression («RNA gene silencing») (Matzke *et al.* 2004, Baulcombe 2004), une structure anormale d'ARN double brin est coupée par la RNase Dicer en courts fragments de 21 à 26 nucléotides. Ces fragments causent l'inactivation des séquences correspondantes par trois mécanismes conjoints : 1) hybridation à la région 3' non traduite de l'ARNm causant l'arrêt de la traduction ; 2) hybridation à l'ARNm causant sa dégradation ; 3) méthylation de l'ADN causant un arrêt de la transcription du gène correspondant. Dans le cas des lignées produites avec le vecteur de T-DNA pD991-AP3, le transcrit produit à partir du promoteur *AP3* contiendrait probablement une partie de la séquence du gène *AP3*, ce qui entraînerait une méthylation et une inactivation du gène *AP3* natif. Après vérification auprès de l'AKF, nous avons appris que ce type d'événement se produit occasionnellement dans leurs lignées. Le phénotype de la lignée *AtPMS1::T-DNA* 4706 est donc probablement causé par la cosuppression du gène *AP3*. Comme le phénotype *ap3* est très prononcé au niveau de la morphologie florale et qu'il cause la stérilité, il devenait difficile de déduire quelles pouvaient être les modifications phénotypiques résultant de l'inactivation du gène *AtPMS1*. La poursuite de l'étude de la méiose chez la lignée 4706 a donc été abandonnée au profit de la lignée *AtPMS1::T-DNA* 5368.

## Phénotype de la lignée 5368

Contrairement à la lignée 4706, la lignée 5368 montrait une morphologie des fleurs tout à fait normale. Ces observations nous indiquent qu'il n'y a pas de cosuppression d'*AP3* chez la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA*. Le phénotype observé dans la lignée *AtPMS1::T-DNA* est donc vraisemblablement lié à une perte de fonction d'*AtPMS1*.

## Fertilité résiduelle : comparaison avec *S. cerevisiae* et *M. musculus*, effet méiotique ou mitotique ?

Chez les mutants *AtPMS1::T-DNA* de la lignée 5368, on observe une baisse de fécondité de l'ordre de 65 à 80 %. Cette baisse est plus marquée que chez les mutants *Scpms1* (baisse de 15-20 %) mais est moins importante que chez les mutants *Mmpms2* (stérilité mâle). Cette variation peut s'expliquer par les différences importantes au niveau de la biologie de la reproduction et de la méiose chez ces organismes (nombre de chromosomes, «checkpoint» de la méiose, stade gamétophytique, taille du génome). Contrairement à la plupart des eucaryotes multicellulaires, *A. thaliana* est capable de terminer la méiose malgré la présence de configurations chromosomiques anormales (fragments, chromosomes univalents, etc.) (Mercier *et al.* 2001, Couteau *et al.* 1999, Grelon *et al.* 2001, Yang *et al.* 1999). De plus, le petit nombre de chromosomes chez *A. thaliana* augmente fortement les chances d'obtenir des produits méiotiques normaux malgré des configurations chromosomiques anormales. La fertilité plus élevée des mutants *Scpms1* pourrait s'expliquer par une moins grande importance du système MMR à la méiose chez la levure (une part importante des «crossing-over» est indépendante de MSH4, MSH5, MLH1 et MLH3) ou par la taille 10 fois plus petite de son génome (13,8 Mb contre 125 Mb chez *A. thaliana*) (Kolas et Cohen. 2004). Il est également possible que l'inactivation d'*AtPMS1* affecte le développement des gamétophytes haploïdes.

À quoi serait due cette baisse de fécondité ? Nous croyons qu'une part de la baisse de fécondité des mutants *AtPMS1::T-DNA* s'explique par les anomalies de la méiose. Si la fréquence des anomalies de la méiose est la même chez les mégasporocytes que chez les

microsporocytes, les anomalies de la méiose seraient responsables d'une baisse de fécondité d'environ 20 %. Cette participation des anomalies de la méiose à la baisse de fécondité est possiblement plus importante si la fréquence des anomalies est plus élevée chez les mégasporocytes. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de procéder à une étude cytogénétique des mégasporocytes.

De plus, *AtPMS1* pourrait jouer un rôle important lors des divisions mitotiques nécessaires à la maturation des gamétophytes. Cette hypothèse est compatible avec les résultats du test de ségrégation des allèles : les gamétophytes mutants sont sous-représentés chez les plantes hétérozygotes (voir la discussion sur la ségrégation plus loin). Cet effet de baisse de viabilité des gamétophytes pourrait être lié à l'inactivation partielle du système MMR. Un effet de découplage entre la reconnaissance des mésappariements par les *MutS $\alpha/\beta$*  et la réparation est envisageable. Le découplage entre la reconnaissance et la réparation d'une lésion à l'ADN peut causer un ralentissement ou même l'arrêt de la réplication de l'ADN. Cela pourrait aussi impliquer la présence d'un point chaud de mutation dans un gène essentiel au développement des gamétophytes. Comme les gamétophytes sont haploïdes, toute mutation a un effet immédiat, et toute réduction dans le nombre de gamétophytes viables (surtout de mégagamétophytes) se traduirait par une réduction du nombre de graines.

Un problème important rencontré lors des tests de fécondité doit cependant être souligné. Lors de nos essais, la production de graines chez les plants sauvages (15-20 graines/silique) fut très inférieure à ce qui est rapporté dans la littérature (40-60 graines/silique). Ces résultats suggèrent que les conditions de croissance n'étaient pas optimales. Les essais de fécondité ont donc été réalisés dans des conditions de stress qui ont pu modifier les effets de la mutation *AtPMS1::T-DNA* sur la fécondité.

### **Ségrégation défavorisant l'allèle mutant : particularité des homologues de MutL d'*A. thaliana***

Nous avons obtenu un ratio de 2 résistants pour 3 sensibles au sein d'une population en ségrégation pour le T-DNA de la lignée 5368, ce qui représente une déviation importante par rapport au ratio phénotypiques attendu (3R:1S). Un biais dans la fréquence de transmission des deux allèles pourrait expliquer ce ratio phénotypiques modifié. En effet, si la fréquence de transmission des allèles est de 78 % pour *AtPMS1* et 22 % pour *AtPMS1::T-DNA* (au lieu de 50:50), on obtiendrait un ratio phénotypiques de 0,39 résistants : 0,61 sensibles. Un tel biais de la ségrégation des allèles constitue une observation nouvelle car la ségrégation est normale chez les souris et les levures hétérozygotes pour l'inactivation de *MmPMS2* et *ScPMS1*, les homologues d'*AtPMS1* chez ces deux espèces. Ce qui rend cette observation encore plus intéressante est le fait qu'un biais semblable est observé pour le gène *AtMLH1* (E. Dion et F. Belzile, communication personnelle). Cependant, ce n'est pas le cas pour le gène *AtMSH2* (Leonard *et al.* 2003), une situation qui semble indiquer que le problème de ségrégation n'est pas causé par un défaut général du système MMR mais plutôt par le défaut de MutL $\alpha$ . Les problèmes de distorsion de la ségrégation des allèles chez les mutants défectueux pour un homologue de *MutL* semblent particuliers aux plantes. Le stade haploïde des gaméophytes est possiblement en cause.

La distorsion dans la ségrégation des allèles chez les gaméophytes pourrait être causée par une diminution de la vigueur des gaméophytes *AtPMS1::T-DNA* ou par leur mortalité. S'ils sont moins vigoureux, les grains de pollen portant l'allèle mutant ont une plus faible probabilité de féconder un ovule : les grains de pollen portant l'allèle sauvage sont donc favorisés. Comme une telle compétition n'existe pas au sein des ovules, une plus faible vigueur des ovules portant l'allèle mutant serait vraisemblablement moins sujet à induire un biais. L'examen du biais de ségrégation chez les deux sexes, permettrait de vérifier cette première hypothèse.

La seconde hypothèse (mortalité des gaméophytes *AtPMS1::T-DNA*) est particulièrement intéressante parce qu'elle concorde avec la baisse de fécondité observée chez les mutants.



La fréquence d'allèle observées (78 % *AtPMS1* et 22 % *AtPMS1::T-DNA*) correspond à 72 % d'attrition des gamétophytes portant l'allèles *AtPMS1::T-DNA* (voir annexe 2 pour le détail des calculs). Le fréquence d'allèle observée lors du test de ségrégation correspondent donc à une survie de 28 % des gamétophytes mutants. Un taux de survie de 28 % des gamétophytes mutant résulterait en une fécondité de 28 % chez un plant homozygote mutant, ce qui concorde avec la fécondité observée chez les mutants *AtPMS1::T-DNA* (22 à 33 %).

### **Cytogénétique de la méiose de la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA***

Dans cette étude, comme dans des études précédentes (Mercier *et al.* 2001, Couteau *et al.* 1999, Grelon *et al.* 2001, Yang *et al.* 1999), nous avons constaté que la méiose chez *A. thaliana* peut se dérouler jusqu'à son terme même en présence d'anomalies qui déclencherait un arrêt de la méiose chez la plupart des autres espèces. Les anomalies de la méiose présentes chez la lignée *AtPMS1::T-DNA* 5368 sont la fragmentation des chromosomes et des défauts dans la ségrégation des chromosomes chez 16 % des microsporocytes.

Le comptage des chromosomes méiotiques chez *A. thaliana* est difficile. En effet, leur petite taille est proche de la limite des structures discernables au microscope optique. Lorsque les chromosomes sont bien séparés, les décomptes sont fiables mais dans les cas de superposition de chromosomes, les décomptes sont incertains. Malheureusement, plusieurs cellules qui montrent des anomalies de la méiose ont des décomptes de chromosomes incertains (voir tableau 10 en annexe) et ont été exclues. Les fréquences d'anomalies avec et sans les décomptes incertains ont été comparées pour s'assurer que l'exclusion de ces données n'introduisait pas de biais dans nos analyses. L'inclusion des décomptes incertains n'affecte pas la fréquence d'anomalies sauf pour les stades anaphase II à tétrade de la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA* où le taux d'anomalies passe de 19 % à 9 % ( $\chi^2=5,57$ ). Cette différence pourrait s'expliquer par une sous-estimation des anomalies dans les cellules écartées. Par exemple, sept cellules écartées indiquées «normales» avaient des incertitudes

de comptage sur plusieurs groupes de chromosomes qui pouvaient concorder à la fois avec une partition normale ou anormale des chromosomes (ex.: 5 ou 6 + 5 + 5 + 4 ou 5). Si ces cellules sont comptabilisées comme anormales, la fréquence d'anomalies passe à 19 %. Ceci semble confirmer que le retrait des décomptes incertains n'insère pas de biais important dans nos résultats. Un microsporocyte *AtPMS1::T-DNA* avec une anomalie de distribution des chromosomes après la métaphase II a malgré tout été inclus (figure 11 B) dans les données. Cette cellule a un décompte de chromosome partiellement incertain, mais une anomalie de partition des chromosomes est indéniable. Cette cellule a été incluse comme représentante des anomalies de partitions observables après la métaphase II.

### **Fragmentation des chromosomes méiotiques et DSB**

Chez le mutant *AtPMS1::T-DNA*, les fragments apparaissent avant la fin de la prophase I et leur fréquence se maintient au cours des phases suivantes. Ce patron de fragmentation semble indépendant de la partition des chromosomes en anaphase I ou II. Ceci indique que le mutant *AtPMS1::T-DNA* ne cause pas l'enchevêtrement des chromosomes. Donc l'inactivation d'*AtPMS1* ne cause pas la formation de structures de recombinaison aberrantes et *AtPMS1* n'est pas non plus impliqué dans la résolution normale des intermédiaires de recombinaison. Ce patron de fragmentation serait plutôt conséquent avec un défaut de réparation des DSB provenant de la réplication de l'ADN ou encore à un défaut d'initiation de la réparation de quelques DSB introduites lors du processus de recombinaison.

Les mutants d'*A. thaliana* avec fragmentation des chromosomes méiotiques impliquent tous des gènes liés à la recombinaison ou au traitement des DSB [*AtSYN1* (Bai *et al.* 1999, Peirson *et al.* 1997), *AtATM* (Garcia *et al.* 2000, Garcia *et al.* 2003) et *AtMEI1* (Grelon *et al.* 2003, He *et al.* 1996, Ross *et al.* 1997)]. Le patron de fragmentation qui se rapproche le plus de celui observé chez le mutant *AtPMS1::T-DNA* est celui d'*Atmei1*. Chez ce mutant, il y a une fragmentation des chromosomes qui est indépendante d'*AtSPO11-1*, des ponts chromosomiques et des anomalies de ségrégation (chromosomes retardataires et extra-nucléaires) en anaphase I. Les mutants *Atmei1* ne sont pas sensibles aux agents causant des

DSB. AtMEI1 a probablement une fonction dans la réparation des dommages liés à réplication de l'ADN (Grelon *et al.* 2003).

La fragmentation limitée des chromosomes, observée chez les mutants *AtPMS1::T-DNA*, indique qu'*AtPMS1* joue un rôle mineur au niveau du traitement des DSB. Chez les autres eucaryotes, il est peu probable que *PMS1* soit directement impliqué dans la réparation des DSB, mais certains indices sont compatibles avec la possibilité d'un rôle indirect. Par exemple, l'implication de la nucléase *Exo1* dans la résection des DSB et la capacité de *PMS1* d'interagir avec *Exo1* dans le cadre du MMR post-répliatif. Dans ces conditions, on peut soupçonner qu'une DSB se produisant à proximité de la fourche de réplication aurait plus de facilité à recruter *Exo1* grâce à la proximité de *PMS1*. Une autre possibilité pourrait être un effet de stabilisation du complexe de réparation post-répliation par la présence d'*AtPMS1*. *AtPMS1* ne jouerait pas rôle dans la réparation des DSB, mais son absence diminuerait légèrement l'efficacité du complexe de réparation.

### **Défaut de ségrégation des chromosomes : erreur en métaphase I ou II ?**

La présence de fragments de chromosomes dès la prophase I indique des problèmes au niveau des étapes précoces de la méiose (synapses et recombinaison). De plus, deux cellules en métaphase I présentant une ségrégation anormale des chromosomes ont été observées. Ceci démontre clairement des anomalies de ségrégation lors de la métaphase I. Les défauts de ségrégation en métaphase I proviennent généralement d'une déficience des chiasmas et remontent généralement à la prophase : anomalies de synapse, diminution de la fréquence de recombinaison ou déstabilisation des protéines responsables du maintien des chiasmas.

Malheureusement, presque tous les microsporocytes *AtPMS1::T-DNA* avec une anomalie de ségrégation des chromosomes après la métaphase II ont un décompte incertain des chromosomes. Il faut donc interpréter ces résultats avec grande précaution. Une cellule possède un chromosome extra-nucléaire qui pourrait provenir d'une erreur en métaphase I

ou II (fig. 11 C). L'autre cellule anormale conservée (fig. 11 B) montre une incertitude de décompte dans 3 des 4 groupes de chromosomes. Deux répartitions anormales balancées sont possibles pour cette cellule : 6+6+4+4 ou 6+5+5+4. Ces répartitions représentent respectivement une erreur de ségrégation des chromosomes provenant de la métaphase I ou II. Il n'est donc pas possible de conclure à la présence ou à l'absence d'anomalies de partitions des chromosomes à la métaphase II.

### **Défaut de ségrégation en métaphase I : synapse, recombinaison ou chiasma**

Les mutants d'*A. thaliana* avec des anomalies dans la ségrégation des chromosomes méiotiques impliquent des gènes liés à la synapse des chromosomes, à la recombinaison et au maintien des chiasmats [*AtSPO11-1* (Grelon *et al.* 2001), *AtDMC1* (Doutriaux *et al.* 1998), *AtSWI1* (Mercier *et al.* 2001), *AtSKP1* (Yang *et al.* 1999), *AtMSH4* (Higgins *et al.* 2004) et *AtMEI1* (Grelon *et al.* 2003)]. Parmi ceux-ci, l'inactivation des gènes *AtMEI1*, *AtSPO11-1*, *AtDMC1* ou *AtMSH4* cause des anomalies de ségrégation qui se rapprochent de celles observées pour *AtPMS1::T-DNA*.

SPO11 est la topoisomérase impliquée dans la formation des DSB nécessaires à l'initiation de la recombinaison. L'inactivation de *SPO11* bloque la recombinaison ce qui empêche généralement l'assemblage du complexe synaptonémal. DMC1 est un homologue de la recombinase RecA de *E. coli* qui est impliqué dans la recombinaison méiotique. *AtDMC1* est nécessaire à l'établissement ou au maintien des bivalents, mais son absence ne cause pas de fragmentation des chromosomes. Il n'y a donc pas de production DSB ou elles sont réparées très efficacement. *AtMEI1* est probablement impliquée dans la réparation des dommages liés à réplication de l'ADN. *MSH4* est essentiel à la recombinaison dépendant de l'interférence.

Les anomalies de ségrégation des chromosomes méiotiques du mutant *AtPMS1::T-DNA* ressemblent à une forme très atténuée des anomalies décrites pour les mutants *Atdmc1*,

*Atspo11-1* et *Atmsh4* : une partition aléatoire ou inégale des chromosomes suite à la métaphase I avec la présence occasionnelle de chromosomes retardataires et de ponts chromosomiques. Ce type d'anomalies correspond à une déficience des chiasmas qui sont nécessaires à une ségrégation correcte lors de la métaphase I (Dawe 1998). Les chiasmas sont aussi les structures physiques associées à la recombinaison. *AtMSH4*, *AtSPO11* et *AtDMC1* sont impliquées dans la recombinaison méiotique. Leur inactivation bloque la recombinaison (donc pas de chiasmas) ce qui cause les anomalies de ségrégation. Les anomalies de ségrégation de la lignée *AtPMS1::T-DNA* sont probablement la conséquence d'une diminution du nombre des chiasmas ou de la recombinaison.

D'un autre côté, les anomalies de ségrégation d'*AtPMS1::T-DNA* sont aussi similaires à ce qui est observé chez les mutants *Atmei1*. Chez les mutants *Atmei1*, les anomalies de ségrégation sont indépendantes de l'activité d'*AtSPO11-1* (et donc des DSB introduites pour la recombinaison). L'action proposée pour *AtMEI1* est située au niveau de la réparation des dommages après la réplication. Il est donc aussi possible que les problèmes de ségrégation du mutant *AtPMS1::T-DNA* résultent d'un défaut de réparation des dommages après la réplication. Pour différencier ces deux possibilités, il serait utile de déterminer le taux de recombinaison chez un mutant *Atpms1*.

La fréquence d'anomalies de ségrégation suite à la métaphase I correspond à une ségrégation aléatoire chez environ 4 % des chromosomes. On peut donc supposer que 4 % des chromosomes n'ont pas de chiasmas. La fréquence normale de chiasmas pour l'écotype WS est de 9,24 / cellule soit de 1.54 à 2.14 par chromosome (Sanchez-Moran *et al.* 2002). Une baisse de la fréquence des chiasmas de 30 % pourrait suffire à produire la fréquence d'erreurs de ségrégation de chromosomes que nous avons observée.

### **Comparaison cytogénétique entre *AtPMS1::T-DNA* et *Mmpms2***

L'inactivation du gène *MmPMS2* cause des anomalies de la synapse à la méiose (Baker *et al.* 1995). Pour expliquer ces problèmes d'établissement de la synapse, les auteurs ont

proposé deux hypothèses : la présence d'un 'hot spot' de mutation dans un gène impliqué dans la synapse ou une action directe de MmPMS2, peut-être au niveau de la recherche d'homologie. Les anomalies de fragmentation et de ségrégation observées chez les mutants *Atpms1* sont compatibles avec un défaut partiel de la synapse. Les différences observées quant aux conséquences finales sur la méiose peuvent facilement s'expliquer par les différences de biologie de la méiose entre la souris et *A. thaliana* : faible taille du génome facilitant la synapse chez *A. thaliana*, tolérance à l'asynapsie lors de la méiose chez *A. thaliana* et faible nombre de chromosomes facilitant la ségrégation chez *A. thaliana*. Pour confirmer la similitude, il faudrait étudier la synapse des chromosomes chez les mutants *AtPMS1::T-DNA*.

## **Hypothèses sur la fonction méiotique d'AtPMS1**

Les anomalies méiotiques observées chez la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA* peuvent toutes être reliées à un ensemble d'événements méiotiques connexes : la réparation des DSB, la recombinaison et les chiasmas. Les anomalies de ségrégation des allèles semblent plutôt liées à une fonction de réparation mitotique lors de la maturation des gamétophytes.

Une première hypothèse pour les fonctions méiotiques d'AtPMS1 est une implication dans la recombinaison, probablement lors de l'initiation et de la propagation de l'hétéroduplexe pour former la double jonction de Holliday. Un rôle d'AtPMS1 dans la recherche d'homologie lors de l'invasion de l'ADN bicaténaire par l'ADN simple brin est envisageable à la lumière du fonctionnement des protéines du système MMR (Baker *et al.* 1995). L'absence d'AtPMS1 diminuerait l'efficacité du traitement de la DSB. Il y aurait moins de chiasmas et plus de chances que la DSB résulte en la fragmentation d'un chromosome.

Une deuxième hypothèse est une implication d'AtPMS1 dans la réparation des DSB dans le contexte de la réplication de l'ADN avant la méiose. Tel que mentionné précédemment, cette action pourrait se faire par le biais de la nucléase Exo1.

Une troisième hypothèse est l'intégration d'AtPMS1 dans les complexes de recombinaison ou de réparation des DSB sans participation directe d'AtPMS1 aux événements. AtPMS1 pourrait être intégré à un complexe de réparation post-réplivative ou aux nodules de recombinaison : l'absence d'AtPMS1 déstabiliserait le complexe, qui serait alors moins efficace. Les homologues de MutL intégrés aux nodules de recombinaison sont MLH1 et MLH3, mais la présence de PMS1 n'a pas encore été testée. Une immuno-localisation fine d'AtPMS1 à la méiose serait nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

Une dernière hypothèse mérite d'être soulevée : l'absence d'AtPMS1 pourrait nuire au fonctionnement d'AtMLH1. Il a été démontré que la surexpression (>100x) de ScMLH1 cause un phénotype d'inactivation du MMR (Shcherbakova *et al.* 2001) qui est causé par une faible dimérisation de ScMLH1. L'homodimère MLH1 non-fonctionnel peut remplacer les hétérodimères dans les complexes formés avec d'autres protéines. Ici, l'absence d'AtPMS1 causerait un surplus relatif d'AtMLH1. Si ce surplus suffisait pour une homodimérisation d'AtMLH1, le phénotype observé pourrait être l'effet de la diminution de fonction d'AtMLH1. Nos observations sont compatibles avec un défaut partiel de MLH1, bien connu pour son implication dans promotion de la recombinaison et des chiasmats.

### **Synthèse sur la lignée *AtPMS1::T-DNA* 5368**

Les effets phénotypiques de la mutation *AtPMS1::T-DNA* chez la lignée 5368 sont une baisse de fécondité de l'ordre de 65 à 80 %, un biais de la ségrégation des allèles au sein d'une population en ségrégation pour le T-DNA et des anomalies cytogénétique chez 16 % des microsporocytes (fragmentation et défauts de ségrégation des chromosomes). Une part de la baisse de fécondité des mutants *AtPMS1::T-DNA* s'explique par les anomalies de la méiose. Il est également possible que l'inactivation d'*AtPMS1* affecte le développement des gamétophytes haploïdes. Le biais de la ségrégation des allèles au sein d'une population en ségrégation pour le T-DNA est particulière aux homologues de MutL chez *A. thaliana* et le stade haploïde des gamétophytes est possiblement en cause. L'hypothèse de la mortalité des gamétophytes *AtPMS1::T-DNA* est particulièrement intéressante parce qu'elle concorde avec la baisse de fécondité observée chez les mutants. Les anomalies méiotiques de la

lignée 5368 *AtPMS1*::T-DNA sont potentiellement dues à un ensemble d'événements méiotiques connexes : la réparation des DSB, les chiasmas et la recombinaison. Nous avons soulevé quatre hypothèses concernant les fonctions méiotiques d'*AtPMS1* qui pourront faire l'objet d'expérimentations futures.



## CONCLUSION

Il a été rapporté précédemment que l'inactivation d'AtPMS1 cause l'inactivation du MMR. Nous avons rapporté ici la première caractérisation méiotique d'un mutant MMR *A. thaliana*. L'inactivation d'AtPMS1 cause une baisse de fécondité de 65 à 80 %, la ségrégation anormale de l'allèle mutant au sein d'une population provenant d'un hétérozygote et des anomalies cytogénétiques chez 16 % des microsporocytes (fragmentation et ségrégation aléatoire des chromosomes). L'effet sur la ségrégation est particulier aux homologues de MutL chez *A. thaliana*. Les effets sur la fécondité sont légèrement différents de ce qui est observé chez la levure *S. cerevisiae* et la souris.

Les fonctions de PMS1 dans le système MMR et à la méiose semblent conservées chez *A. thaliana* par rapport aux autres eucaryotes. Cependant, des études plus poussées, notamment au niveau de la méiose des macrosporocytes, de la synapse et de la recombinaison, seront nécessaires pour confirmer que les fonctions méiotiques d'AtPMS1 sont les mêmes que chez les autres eucaryotes.

Un effet particulier de l'inactivation d'AtPMS1 a été observé : le biais de la ségrégation des allèles au sein d'une population en ségrégation pour le T-DNA. Cette particularité est aussi partagée avec AtMLH1 mais pas avec AtMSH2. Il sera intéressant de vérifier si cette particularité des homologues de MutL est liée à la biologie de la reproduction des plantes (stade gamétophytique : effet mâle ou femelle, vigueur ou survie, etc.) ou est spécifique à *A. thaliana*.

La compréhension du fonctionnement du système MMR chez les plantes, avec ses similitudes et ses particularités par rapport aux autres eucaryotes, commence à prendre forme. Ces connaissances ouvriront peut-être des avenues nouvelles pour le développement des espèces végétales cultivées.

## BIBLIOGRAPHIE

- (Abdelnoor *et al.* 2003) Abdelnoor R.V., Yule R., Elo A., Christensen A.C., Meyer-Gauen G. et Mackenzie S.A ; PNAS (2003) 100(10) : 5968-5973. Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS.
- (Adé *et al.* 1999) Adé, J., Belzile, F., Philippe, H., Doutriaux, M.-P. ; Mol. Gen. Genet. (1999) 262 : 239-249. Four mismatch repair paralogues coexist in *Arabidopsis thaliana* : AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6-1 and AtMSH6-2.
- (Adé *et al.* 2001) Adé, J., Haffani, Y. et Belzile, F. ; Genome (2001) 44 : 651-657. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* mismatch repair gene MSH2.
- (Alalouf *et al.* 1990) Alalouf S., Labelle D. et Ménard J. ; Introduction à la statistique appliquée (deuxième édition). Édition Addison-Wesley, Mtl, 1990.
- (Alani *et al.* 1994) Alani, E., Reenan, R.A.G. et Kolodner, R.D. ; Genetics (1994) 137 : 19-39. Interaction between Mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.
- (Alou *et al.* 2004) Alou A.H., Azaiez A., Jean M. et Belzile F. ; Plant Mol. Biol (2004) 56 : 339-349. Involvement of the *Arabidopsis thaliana* AtPMS1 gene in somatic repeat instability.
- (Argueso *et al.* 2004) Argueso J.L., Wanat J., Gemici Z. et Alani E. ; Genetics (2004) 168(4) : 1805-1816. Competing crossover pathways act during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*.
- (Aylon et Kupiec 2004) Aylon Y. et Kupiec M. ; DNA Repair (Amst). (2004) 3(8-9) : 797-815. DSB repair: the yeast paradigm.
- (Bai *et al.* 1999) Bai, X., Peirson, B.N., Dong, F., Xue, C. and Makaroff, C.A. ; Plant Cell (1999) 11 : 417-430. Isolation and Characterization of SYN1, a RAD51-like Gene Essential for Meiosis in *Arabidopsis*.
- (Baker *et al.* 1995) Baker, S.M., Bronner, C.E, Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., Flavell, R.A. et Liskay, R.M ; Cell (1995) 82 : 309-319. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis.
- (Baker *et al.* 1996) Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T. et Liskay, R.M. ; Nat. Genet. (1996) 13(3) : 336-342. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over.
- (Barzilai et Yamamoto 2004) Barzilai A. et Yamamoto K.-I. ; DNA Repair (2004) 3 : 1109-1115. DNA damage response to oxidative stress.
- (Baulcombe 2004) Baulcombe D. ; Nature (2004) 431 : 356-363. RNA silencing in plants.
- (Bleuyard *et al.* 2005) Bleuyard J.-Y., Gallego M.E. et White C.I. ; DNA Repair (2005) publication en ligne avant impression (doi:10.1016/j.dnarep.2005.08.017). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants
- (Bowers *et al.* 2000) Bowers, J., Tran, P.T., Liskay, R.M. et Alani, E. ; J. Mol. Biol. (2000) 302 : 327-338. Analysis of yeast MSH2-MSH6 suggests that the initiation of mismatch repair can be separated into discrete steps.

- (Bowers *et al.* 2001) Bowers, J., Tran, P.T., Joshi, A., Liskay, R.M. et Alani, E. ; J. Mol. Biol. (2001) 306 : 957-968. MSH-MLH complexes formed at a mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp.
- (Bowman 1994) Arabidopsis An atlas of morphology and development. 1994, John Bowman, Springer-Verlag New-York inc, 450 pages.
- (Bowman *et al.* 1991) Bowman, J.L., Smyth, D.R. et Meyerowitz, E.M. ; Development (1991) 112 : 1-20. Genetic interaction among floral homeotic genes of Arabidopsis.
- (Bowman *et al.* 1989) Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. ; The Plant Cell (1989) 1(1) : 37-52. Genes directing flower development in Arabidopsis.
- (Caryl *et al.* 2003) Anthony P. Caryl, Gareth H. Jones et Christopher H. Franklin ; J. Exp. Bot. (2003) 54(380) : 25-28. Dissecting plant meiosis using Arabidopsis thaliana mutants.
- (Chambers *et al.* 1996) Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J. et Borts, R.H. ; Mol. Cell. Biol. (1996) 16(11) : 6110-6120. The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss.
- (Chauhan *et al.* 2000) Chauhan, D.P., Yang, Q., Carethers, J.M., Marra, G., Chang, C.L., Chamberlain, S.M. at Boland, R. ; Clinical Cancer Research (2000) 6 : 3827-3831. Antisense inhibition of hMLH1 is not sufficient for loss of DNA mismatch repair function in the HCT116+chromosome 3 cell line.
- (Clikeman *et al.* 2001) Clikeman, J.A., Wheeler, S.L. and Nickoloff, J.A. ; Genetics (2001) 157 : 1481-1491. Efficient Incorporation of Large (>2 kb) Heterologies Into Heteroduplex DNA : Pms1 / Msh2-Dependant and -Independent Large Loop Mismatch Repair in Saccharomyces cerevisiae.
- (Coïc *et al.* 2000) Coïc, E., Gluck, L. et Fabre, F. ; EMBO Journal (2000) 19(13) : 3408-3417. Evidence for short-patch mismatch repair in Saccharomyces cerevisiae.
- (Costa *et al.* 2003) Costa R.M.A, Chiganças V., da Silva Galhardo R., Carvalho H. et Menck C.F.M. ; Biochimie (2003) 85 : 1083-1099. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway.
- (Courcelle *et al.* 2001) Courcelle J., Ganesan A.K. et Hanawalt P.C. ; BioEssays (2001) 23 : 463-470. Therefore, what are recombination proteins there for?
- (Couteau *et al.* 1999) Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D., and Doutriaux, M.-P. ; Plant Cell (1999) 11 : 1623-1634. Random Chromosome Segregation without Meiotic Arrest in Both Male and Female Meicytes of a dmc1 Mutant of Arabidopsis.
- (Culligan et Hays 2000) Culligan, K.M. et Hays, J.B ; The Plant Cell (2000) 12 : 991-1002. Arabidopsis MutS homologs - AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a novel AtMSH7 - form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA.
- (Datta *et al.* 1996) Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G.F. et Jink-Robertson, S. ; Mol. Cell Biol. (1996) 16(3) : 1085-1093. Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in Saccharomyces cerevisiae.
- (Datta *et al.* 1997) Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., Jinks-Robertson, S. ; PNAS (1997) 94 : 9757-9762. Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast.
- (Dawe 1998) R. Kelly Dawe, ; Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1998) 49 : 371-395. Meiotic chromosome organization and segregation in plants

- (de Vries *et al.* 1999) de Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P. et te Riele, H. ; *Genes and development* (1999) 13 : 523-531. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis.
- (Dong *et al.* 2002) Dong C., Whitford R. et Langridge P. ; *Genome* (2002) 45(1) : 116-124. A DNA mismatch repair gene links to the Ph2 locus in wheat.
- (Doutriaux *et al.* 1998) Doutriaux, M.-P., Couteau, F., Bergounioux, C., White, C. ; *Mol Gen Genet* (1998) 257 : 283-291. Isolation and characterisation of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*.
- (Dzierzbicki *et al.* 2004) Dzierzbicki P., Koprowski P., Fikus M.U., Malc E. et Ciesla Z. ; *DNA Repair* (2004) 3(4) : 403-411. Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependant pathway.
- (Edelmann *et al.* 1996) Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., Pollard, J.W., Kolodner, R.D. et Kucherlapati, R ; *Cell* (1996) 85 : 1125-1134. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice.
- (Edwards *et al.* 1991) Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. ; *Nucl. Acids Res.* (1991) 19(6) : 1349. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis.
- (Garcia *et al.* 2000) Garcia V., Salanoubat M., Choisine N. et Tissier A. ; *Nucleic Acids Research* (2000) 28(8) : 1692-1699. An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana* : complete genomic organisation and expression analysis.
- (Garcia *et al.* 2003) Garcia V., Bruchet H., Canescasse D., Granier F., Bouchez D. et Tissier A. ; *Plant Cell* (2003) 15(1) : 119-132. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plant.
- (Gendrel et Dutreix 2001) Gendrel, C.-G. et Dutreix, M ; *Genetics* (2001) 159 : 1539-1545. (CA/TA) microsatellite sequence escape the inhibition of recombination by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*.
- (Golubovskaya 1989) Golubovskaya, I.N. ; *Advances in genetics* (1989) 26 : 149-192. Meiosis in Maize : mei Genes and Conception of Genetic Control of Meiosis.
- (Grelon *et al.* 2001) Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. ; *EMBO Journal* (2001) 20 : 589-600. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants.
- (Grelon *et al.* 2003) Grelon M., Gendrot G., Vezon D. et Pelletier G. ; *Plant Journal* (2003) 35(4) : 465-475. The *Arabidopsis* MEI1 gene encodes a protein with five BRCT domains that is involved in meiosis-specific DNA repair events independant of SPO11-induced DSBs.
- (Habracken *et al.* 1998) Habracken, Y., Sung, P., Prakash, L. et Prakash, S. ; *J. Biological Chemistry* (1998) 273 : 9837-9841. ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes.
- (Hall *et al.* 2001) Hall, M.C., Wang, H., Erie, D.A. and Kunkel, T.A. ; *J. Mol. Biol.* (2001) 312 : 637-647. High Affinity Cooperative DNA Binding by the Yeast Mlh1-Pms1 Heterodimer.
- (Hall *et al.* 2002) Hall, M.C., Shcherbakova, P.V. and Kunkel, T.A. ; *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277(5) : 3673-3679. Differential ATP Binding and Intrinsic ATP Hydrolysis by Amino-terminal Domains of the Yeast MLH1 and Pms1 Proteins.

- (Hawley 2003) Hawley R.S. ; *Current Biology* (2003) 13 : R305-R307. Human meiosis : model organisms address the maternal age effect (Dispatch).
- (He *et al.* 1996) He C., Tirlapur U., Cresti M., Peja M., Crone D.E., Mascarenhas J.P. et He C.P. ; *Sex. Plant Reprod.* (1996) 9 : 54-57. An Arabidopsis mutant show showing aberrations in male meiosis.
- (Heslop-Harrison et Maluszynska 1994) Heslop-Harrison, J.S. and Maluszynska, J. ; Chapter 4 : Molecular Cytogenetics of Arabidopsis. In Arabidopsis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 63-87.
- (Higgins *et al.* 2004) Higgins J.D., Armstrong S.J., Franklin C.H et Jones G.H. ; *Genes Dev.* (2004) 18(20) : 2557-2570. The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*.
- (Hoffmann et Borts. 2004) Hoffmann E.R. et Borts R.H. ; *Cytogenet Genome Res* (2004) 107 : 232-248. Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins.
- (Horlow et Doutriaux 2003) Horlow C. et Doutriaux M.-P. ; *Médecine Science* (2003) 19 : 717-723 .Les mécanismes moléculaires de la méiose chez les plantes.
- (Horwath *et al.* 2002) Horwath M., Kramer W. et Kunze R. ; *Theor. Appl. Genet.* (2002) 105(2-3) : 423-430. Structure and expression of the *Zea mays* mutS-homologs Mus1 and Mus2.
- (Hunter et Borts 1997) Hunter, N. et Borts, R.H. ; *Genes and Development* (1997) 11:1573-1582. Mlh1 is unique among mismatch repair protein in its ability to promote crossing-over during meiosis.
- (Isaacs et Spielmann 2004) Isaacs R.J. et Spielmann H.P. ; *DNA Repair* (2004) 3() : 455-464. A model for initial DNA lesion recognition by NER and MMR based on local conformational flexibility.
- (Jean *et al.* 1999) Jean, M., Pelletier, J., Hilpert, M., Belzile, F. et Kunze, R. ; *Mol. Gen. Genet.* (1999) 262 : 633-642. Isolation et characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana*.
- (Jeyaprakash *et al.* 1994) Jeyaprakash, A., Welch, J.W. and Fogel, S. ; *Mutation research (letters)* (1994) 325 : 21-29. Mutagenesis of yeast MW1043-1B strain has identified the uncharacterized PMS6 DNA mismatch repair gene locus and additional alleles of existing PMS1, PMS2 and MSH2 genes.
- (Jofuku *et al.* 1994) Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Montagu, M.V. et Okamoto, J.K. ; *Plant Cell*, septembre 1994, 6 : 1211-1225. Control of Arabidopsis flower and seed development by homeotic gene APETALA2.
- (Jones *et al.* 2003 ) Jones, G.H., Armstrong, S.J., Caryl, A.P., Franklin, F.C.H ; *Chromosome Research* (2003) 11 : 205-215. Meiotic chromosome synapsis and recombination in *Arabidopsis thaliana* ; an integration of cytological and molecular approaches.
- (Kirkpatrick 1999) Kirkpatrick, D.T. ; *Cell. Mol. Life Sci.* (1999) 55 :437-449. Roles of the DNA mismatch repair and nucleotide excision repair proteins during méiosis.
- (Kneitz *et al.* 2000) Kneitz, B., Cohen, P.E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M.F., Hou, H. Jr, Kolodner, R.D., Kucherlapati, R., Pollard, J.W et Edelman, W. ; *Genes and Development* (2000) 14 : 1085-1097. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice.

- (Kolas et Cohen. 2004) Kolas N.K. et Cohen P.E. ; *Cytogenet Genome Res* (2004) 107 : 216-231. Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination.
- (Kovalchuk *et al.* 2000) Kovalchuk, I., Kovalchuk, O. et Hohn, B. ; *EMBO Journal* (2000) 19(17) : 4431-4438. Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants
- (Kramer *et al.* 1996) Kramer, W., Fartman, B. et Ringbeck, E.C. ; *Mol. Gen. Genet.*, 1996, 252 : 275-283. Transcription of mutS and mutL-homologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* during the cell cycle.
- (Krysan *et al.* 1996) Krysan, P.J., Young, J.C, Tax, F. et Sussman, M.R. ; *PNAS* (1996) 93 : 8145-8150. Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport.
- (Krysan *et al.* 1999) Krysan, P., Young, J.C. et Sussman, M.R ; *Plant Cell* (1999) 11 : 2283-2290. T-DNA as an insertion mutagen in *Arabidopsis*.
- (Kunkel et Bebenek 2000) Kunkel T.A. et Bebenek K. ; *Annu. Rev. Biochem.* (2000) 69 : 497-529. DNA replication fidelity.
- (Kunkel et Erie 2005) Kunkel T.A et Erie D.A. ; *Ann. Rev. Biochem.* (2005) 74 : 681-710. DNA mismatch repair.
- (Lamb et Hassold 2004) Lamb, N.E. ; Hassold, T.J. ; *New England Journal of Medicine* (2004) 351(19) : 1931-1934. Nondisjunction - A view from ringside. (Perspective)
- (Leonard *et al.* 2003) Leonard, J.M., Bollmann S.R. et Hays J.B. ; *Plant Physiology* (2003) Vol. 133, pp. 1-11. Reduction of Stability of *Arabidopsis* Genomic and Transgenic DNA-Repeat Sequences (Microsatellites) by Inactivation of AtMSH2 Mismatch-Repair Function
- (Li *et al.* article sous presse)
- (Lipkins *et al.* 2002) Lipkins S.M., Moens P.B., Wang V., Lenzi M., Shanmugarajah D., Gilgeous A., Thomas J., Cheng J., Touchman J.W., Green E.D., Schwartzberg P., Collins F.S. et Cohen P.E. ; *Nat. Genet.* (2002) 31 : 385-390. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice.
- (Luo *et al.* 2000) Luo M.-C., Yang Z.-L, Kota R.S. et Dvorák J. ; *Genetics* (2000) 154 : 1301-1308. Recombination of chromosomes 3Am and 5Am of *Triticum monococcum* with homéologous chromosomes 3A and 5A of wheat: the distribution of recombination across chromosomes.
- (Marcon et Moens 2003) Marcon E. et Moens P. ; *Genetics* (2003) 165 : 2283-2287. MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes.
- (Marti *et al.* 2002) Marti, T.M, Kunz, C. et Fleck, O. ; *J. Cellular Physiol.* (2002) 191 : 28-41. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways.
- (Matzke *et al.* 2004) Matzke M., Aufsatz W., Kanno T., Daxiger L., Papp I., Mette M.F. et Matzke A.J.M ; *Biochemica and Biophysica Acta* (2004) 1677 : 129-141. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing.
- (McGill *et al.* 1998) McGill, C.B., Holbeck, S.L. et Stathern, J.N. ; *Genetics* (1998) 148 : 1525-1533. The chromosome bias of misincorporations during double-strand break repair is not altered in mismatch repair-defective strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
- (McKinlay Gardner et Sutherland 2004) McKinlay Gardner R.J. et Sutherland G. R. ; *Chromosome abnormalities and genetic counseling*, third edition dans Oxford

- monographs on medical genetics no. 46, Oxford university press, Oxford, New York 2004.
- (Mercier *et al.* 2001) Mercier, R., Vezon, D., Bullier, E., Motomayor, J.C., Sellier, A., Lefèvre, F., Pelletier, G. and Horlow, C. ; *Genes Dev.* (2001) 15 :1859-1871. SWITCH1 (SWI1) : a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis.
- (Meyer *et al.* 2001) Meyer, C., Scheller, J. et Kramer, W. ; *Mol. Genet. Genomics* (2001) 265 : 826-836. Transcription of mutS- and mutL-homologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a regulatory cis-element for meiotic induction of MSH2.
- (Modrich et Lahue. 1996) Modrich, P. et Lahue, R ; *Annu. Rev. Biochem.* (1996) 65 : 101-133. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology.
- (Nicholson *et al.* 2000) Nicholson, A., Hendrix, M., Jinks-Robertson, S. et Crouse, G.F. ; *Genetics* (2000) 154 : 133-146. Regulation of mitotic homeologous recombination in yeast : functions of Mismatch repair and nucleotide excision repair genes.
- (Nicolaidis *et al.* 1995) Nicolaidis N.C., Carter K.C., Shell B.K., Papadopoulos N., Vogelstein B. et Kinzler K.W. ; *Genomics* (1995) 30(2) : 195-206. Genomic organization of the human PMS2 gene family.
- (Novak *et al.* 2001) Novak J.E., Ross-Macdonald P.B. et Roeder G.S. ; *Genetics* (2001) 158(3) : 1013-1025. The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution.
- (Orlando et Therman 2001) Human Chromosomes 4th edition. Miller O.J. and Therman E.; 2001, Springer-Verlag, New-York
- (Osborne *et al.* 1997) Osborne L.R., Herbrick J.-A., Greavette T., Heng H.H.Q., Tsui L.-C. et Scherer S.W. ; *Genomics* (1997) 45(2) : 402-406. PMS2-Related genes flank the rearrangement breakpoints associates with Williams syndrome and other diseases on human chromosome 7.
- (Pang *et al.* 1997) Pang, Q., Prolla, T.A. and Liskay, R.M. ; *Mol. Cell. Biol.* (1997) 17(8) : 4465-4473. ; Functional Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA Mismatch Repair Proteins and Their Relevance to human Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Associated Mutations.
- (Peirson *et al.* 1997) Peirson, B.N., Bowling, S.E. and Makaroff, C.A. ; *Plant Journal* (1997) 11(4) : 659-669. A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana* mutant.
- (Petronczki *et al.* 2003) Petronczki M., Siomos M.F. et Nasmyth K. ; *Cell* (2003) 112(4) : 423-440. Un ménage a quatre : the molecular biology of chromosome segregation in meiosis.
- (Prolla *et al.* 1994) Prolla, T.A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R.D. and Liskay, R.M. ; *Science* (1994) 265(5175) : 1091-1093. MLH1, PMS1, and MSH2 Interactions During the initiation of DNA Mismatch Repair in Yeast.
- (Qin *et al.* 2002) Qin J., Baker S., Te Riele H., Liskay R.M. et Arnheim N. ; *J. Hered.* (2002) 93 : 201-205. Evidence for the lack of mismatch-repair directed antirecombination during mouse meiosis.
- (Raven *et al.* 1999) Biology of plants (sixth edition). Raven P.H., Evert R.F. et Eichhorn S.E. ; Édition Freeman Worth, NewYork, 1999

- (Reed 2005) Reed S.H. ; DNA Repair (2005) 4 : 909-918. Nucleotide excision repair in chromatin: The shape of things to come.
- (Reenan et Kolodner 1992) Reenan R.A. et Kolodner R.D. ; Genetics (1992) 132 : 975-985. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions.
- (Roeder 1997) Roeder G.S. ; Genes Dev. (1997) 11 : 2600-2621. Meiotic chromosomes : it takes two to tango.
- (Ross *et al.* 1997) Ross K.J., Fransz P., Armstrong S.J., Vizir I., Mulligan B., Franklin F.C.H. et Jones G.H. ; Chromosome research (1997) 5 : 552-559. Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis thaliana*.
- (Sanchez-Moran *et al.* 2002) Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Santos JL, Franklin FC, Jones GH ; Genetics (2002) 162(3) : 1415-1422. Variation in chiasma frequency among eight accessions of *Arabidopsis thaliana*.
- (Schär *et al.* 1997) Schär, P., Baur, M., Schneider, C. and Kohli, J. ; Genetics (1997) 146 : 1275-1286. Mismatch Repair in *Schizosaccharomyces pombe* Requires the mutL Homologous Gene *pms1*: Molecular Cloning and Functional Analysis.
- (Schwarzacher 2003) Schwarzacher T. ; J. Exp. Bot. (2003) 54(380) : 11-23. Meiosis, recombination and chromosomes : a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants
- (Shcherbakova *et al.* 2001) Shcherbakova, P.V, Hall, M.C, Lewis, M.C., Bennett, S.E., Martin, K.J, Bushel, P.R., Afshari, C.A. et Kunkel, T.A. ; Mol. Cell. Biol. (2001) 21(3) : 940-951. Inactivation of DNA mismatch repair by increased expression of yeast MLH1.
- (Shevelev et Hübscher 2002) Shevelev I.V. et Hübscher U. ; Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2002) 3(5) : 364-376. The 3'-5' exonucleases.
- (Simoens *et al.* 1988) Simoens C.R., Peleman J., Valvekens D., Van Montagu M. et Inze D. ; Gene. (1988) 67(1) : 1-11. Isolation of genes expressed in specific tissues of *Arabidopsis thaliana* by differential screening of a genomic library.
- (Stojic *et al.* 2004) Stojic L., Brun R. et Jiricny J. ; DNA Repair (2004) 3(8-9) : 1091-1101. Mismatch repair and DNA damage signalling.
- (Studamire *et al.* 1999) Studamire B., Price G., Sugawara N., Haber J.E. et Alani E. ; Mol. Cell. Biol. (1999) 19 : 7558-7567. Separation-of-function mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH2 that confer mismatch repair defect but do not affect non-homologous-tail removal during recombination.
- (Surtees *et al.* 2004) Surtees J.A., Argueso J.L. et Alani E. ; Cytogen Gen Res (2004) 107(3-4) : 146-159. Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination.
- (Svetlanov et Cohen 2004) Svetlanov A. et Cohen P. ; Exp. Cell. Res. (2004) 296(1) : 71-79. Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis.
- (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) The Arabidopsis Genome Initiative ; Nature (2000) 408 : 796-815. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*
- (Vieira *et al.* 1990) Vieira M.L.C., Briarty L.G. et Mulligan B.J. ; Annals of Botany (1990) 66 : 717-719. A method for analysis of meiosis in anthers of *Arabidopsis thaliana*.
- (Wang *et al.* 1999) Wang, T.-F., Kleckner, N. et Hunter, N ; PNAS (1999) 96(24) : 13 914-13 919. Functional specificity of MutL homologs in yeast : evidence for three Mlh1-



- based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction.
- (Wang et Kung 2002) Wang, T.-F. et Kung, W.-M. ; Biochem. Biophys. Res. Comm. (2002) 296 : 949-953. Supercomplex formation between Mlh1-Mlh3 and Sgs-Top3 heterocomplexes in meiotic yeast cells.
- (Wildeberg et Meselson 1975) Wildeberg J. et Meselson M. ; PNAS (1975) 72(6) : 2202-2206. Mismatch repair in heteroduplex DNA.
- (Woods *et al.* 1999) Woods, L.M., Hodges, C.A., Baart, E., Baker, S.M., Liskay, M. et Hunt, P.A. ; J. Cell Biol. (1999) 145(7) ; 1395-1406. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly : abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice.
- (Wu *et al.* 2003) Wu S.-Y., Culligan K., Lamers M. et Hays J. ; Nuc. Ac. Res. (2003) 31(20) : 6027-6034. Dissimilar mispair-recognition spectra of Arabidopsis DNA-mismatch-repair proteins MSH2-MSH6 (MutS?) and MSH2-MSH7 (MutS?).
- (Wymer et al) Wymer, C.L., Beven, A.F., Boudonck K. et Lloyd, C.W. ; Chapitre 6 : Confocal microscopy of plant cells dans Methods in molecular biology, vol 122 : confocal microscopy methods and protocols (1999). Edité par S. Paddock, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- (Yang *et al.* 1999) Yang, Y., Karythikeyan, R., Mack, S.E., Vonarx, E.J. and Kunz, B.A. ; Mol. Gen. Genet. (1999) 261 : 777-787. Analysis of yeast pms1, msh2, and mlh1 mutators points to differences in mismatch correction efficiencies between prokaryotic and eukaryotic cells.
- (Yang *et al.* 1999) Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R. and Ma, H. ; PNAS (1999) 96 : 11416-11421. The Arabidopsis SKP1-LIKE1 gene is essential for male meiosis and control homologue separation.

## Ressources internet

(AKF, ressource Internet)

Arabidopsis Knockout Facility : <http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis/Index2.asp>

(NCBI, ressource Internet)

National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

(TAIR, ressource Internet)

The Arabidopsis International Resource : <http://www.arabidopsis.org/>

## Annexe 1 : données cytogénétiques complètes

Tableau 10 : Observations cytogénétiques de la lignée 5368 *AtPMS1::T-DNA* : données retenues et données incluant les méioses écartées à cause de décompte incertain de chromosomes.

	PMS1 sauvage						5368 <i>AtPMS1::T-DNA</i>					
	Comptées <sup>A</sup>			Observées <sup>B</sup>			Comptées <sup>A</sup>			Observées		
	N	A	%A	N	A	%A	N	A	%A	N	A	%A
Prophase I à Métaphase I	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>3.4</b>	48	1	2.1	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>8.1</b>	61	6	9.0
Anaphase I à Métaphase II	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	73	0	0.0	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	51	9	15
Anaphase II à Tétrade	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>4.8</b>	42	2	4.8	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	81	8	9.0*
Total	<b>81</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	163	3	1.8	<b>71</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	193	23	12

A Comptage de chromosomes certain. Données rapportées au tableau 8.

B Toutes les figures méiotiques observée (ajout des décomptes incertain).

\* Différence significative avec les données présentées ( $\chi^2 = 5,57 / \alpha < 0.05$ ).

## Annexe 2 : calculs de fréquence des allèles

Tableau 11 : Calculs de fréquence des allèles dans les gamétophytes en ségrégation.

À gauche : distribution égale entre ovules et pollen. À droite : distribution inégale extrême entre ovules et pollens.

	A = 0.78	a = 0.22		A = 0.61	a = 0.39
A = 0.78	0.61	0.17	A = 1.00	0.61	0.39
a = 0.22	0.17	0.05	a = 0.00	0	0

A = allèle *AtPMS1*.

a = allèle *AtPMS1::T-DNA*.

■ = génotypes résistants à la kanamycine (verts) = 39 %.

■ = génotypes sensibles à la kanamycine (blanc) = 61 %.

Calcul de la fréquence des allèles dans la descendance :

sensible = fréquence *AtPMS1* au carré = 0.61

fréquence de *AtPMS1* =  $\sqrt{0.61} = 0.78$

(fréquence de *AtPMS1*) + (fréquence de *AtPMS1::PMS1*) = 1

fréquence de *AtPMS1::PMS1* =  $1 - 0.78 = 0.22$

Calcul de la fréquence de survie des gamètes porteuses de l'allèle *AtPMS1::T-DNA*.

Pour 100 spores initialement produites chez l'hétérozygote il y a 50 spores *AtPMS1* et 50 spores *AtPMS1::T-DNA*.

0.78 *AtPMS1* = 50 spores *AtPMS1*

0.22 *AtPMS1::PMS1* = 14 spores *AtPMS1::T-DNA* (=  $50 \times 0.22 / 0.78$ )

14/50 = 28% de survie des gamétophytes *AtPMS1::T-DNA*