

Mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*

Anouchka Debast Guyon

► **To cite this version:**

Anouchka Debast Guyon. Mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. <hal-01375860>

HAL Id: hal-01375860

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01375860>

Submitted on 3 Oct 2016

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre



MÉMOIRE
présenté
par

Anouchka GUYON-DEBAST

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**TITRE : « Mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage génique chez
Physcomitrella patens »**

soutenu le 14 Juin 2013 devant le jury suivant :

Sophie Couvé – Présidente
Ariane Gratiot-Weill – Rapporteur
Emmanuel Guiderdoni – Examineur
Christelle Lasbleiz – Tuteur pédagogique
Fabien Nogué – Tuteur scientifique

Mémoire préparé sous la direction de :

Fabien Nogué : Fabien.Nogue@versailles.inra.fr
Institut Jean-Pierre Bourgin INRA-UMR1318, Versailles
et de
Christelle Lasbleiz : Christelle.Lasbleiz@ephe.sorbonne.fr
Laboratoire MMDN U710-UM2-EPHE, Montpellier

Directeur : *David Bouchez*

Directeur : *Jean-Michel Verdier*

Table des matières

<i>Résumé</i>	4
<i>Liste des abréviations</i>	5
<i>Préambule</i>	6
Chapitre 1 : Introduction	7
I. La mousse <i>Physcomitrella patens</i>	8
I. 1. <i>Physcomitrella patens</i>, plante modèle	8
I. 2. Le cycle de vie de <i>Physcomitrella patens</i>	9
I. 3. Multiplication végétative, régénération et transformation	10
II. Le ciblage génique	10
II. 1. Mise en évidence du ciblage génique	11
II. 2. Principe et applications	12
II. 3. Facteurs influençant la fréquence de ciblage	13
II. 3. 1. La longueur des zones d'homologie	13
II. 3. 2. Le locus à cibler.....	13
II. 3. 3. Le type cellulaire	13
II. 3. 4. Importance d'une cassure double brin (CDB)	14
II. 3. 5. Choix du mécanisme de réparation des CDB	15
III. Les mécanismes de réparation de l'ADN	15
III. 1. Les dommages à l'ADN	15
III. 2. La réponse aux dommages de l'ADN	16
III. 3. La réparation des cassures double brin (CDB)	17
III. 3. 1. Le choix de la voie de réparation	17
III. 3. 2. La voie NHEJ (Non Homologous End Joining) classique	18
III. 3. 3. La voie NHEJ alternative	19
III. 3. 4. La voie SSA	19
III. 3. 5. La voie HR	20
III. 4. Les protéines de réparation des CDB chez <i>Physcomitrella patens</i>	21
III. 5. Les mécanismes impliqués dans le ciblage génique	22
IV. La protéine <i>RAD51</i>, un élément clé de la Recombinaison Homologue	22
IV. 1. Structure et domaines	23
IV. 2. Régulation de <i>RAD51</i>	23
IV. 3. Mutants <i>rad51</i>	24
V. Le complexe <i>RAD1-RAD10</i>	26
V. 1. Structure des protéines	26
V. 2. Rôle dans la réparation de cassure simple brin (CSB)	26
V. 3. Rôle dans la réparation de cassure double brin (CDB) : les voies SSA et HR	27
VI. Projet de recherche : Etude des mécanismes de réparation de l'ADN impliqués dans le ciblage génique chez <i>Physcomitrella patens</i>	28

Références bibliographiques..... 30

Résumé

Le ciblage génique est l'intégration d'un fragment d'ADN exogène partageant des homologies de séquences avec un génome receveur, au locus génomique correspondant. On parle alors d'intégration ciblée de façon opposée à l'intégration aléatoire qui se fait de façon non homologue. Le mécanisme moléculaire impliqué dans le ciblage génique est la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, basée sur l'action de la protéine RAD51 qui permet l'échange entre séquences homologues et sur l'action d'endonucléases et de résolvasas qui permettent de rétablir la conformation de la double hélice d'ADN. Chez la plupart des eucaryotes, la transformation génétique avec un fragment d'ADN exogène se fait majoritairement par intégration aléatoire. Il existe cependant quelques exceptions comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que la mousse *Physcomitrella patens*, dans lesquelles les intégrations se font préférentiellement de manière ciblée. Alors que chez la levure, toutes les intégrations ciblées résultent de deux événements de recombinaison homologue conduisant au remplacement du gène, chez la mousse les intégrations ciblées résultent également d'insertions ciblées ou correspondant à un seul événement de recombinaison homologue accompagné d'une intégration qui apparaît comme non homologue. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage génique chez la mousse, lors des remplacements de gène mais également lors de ces insertions ciblées, j'ai réalisé une analyse fonctionnelle des protéines PpRAD51, en utilisant une approche comparative entre une espèce végétale très peu compétente pour le ciblage génique, *Arabidopsis thaliana*, et une espèce végétale très compétente pour le ciblage génique, *Physcomitrella patens*. Cette étude a mis en évidence une disjonction de fonction des protéines PpRAD51 : en effet, la moitié N-terminale de la protéine est fonctionnelle pour les divisions mitotiques mais ne l'est pas pour le ciblage génique. Parallèlement, j'ai mesuré l'effet de l'absence de l'endonucléase RAD1-RAD10 sur le ciblage génique en étudiant les mutants de délétion $\Delta rad1$, $\Delta rad10$ et $\Delta rad1\Delta rad10$. Cette étude a permis de montrer le rôle important de ce complexe endonucléase dans le ciblage génique chez la mousse, et plus particulièrement dans les insertions ciblées.

Mots clés : ciblage génique (GT), recombinaison homologue (HR), réparation de l'ADN, *Physcomitrella patens*, recombinaison RAD51, endonucléase RAD1-RAD10.

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN db : ADN double brin
ADN sb : ADN simple brin
A-NHEJ : NHEJ alternatif
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ATB^R : gène de résistance à un antibiotique (ATB)
ATG : codon d'initiation de la traduction
BER : Base Excision Repair
BET : bromure d'éthidium
CDB : Cassure Double Brin
Cdk : cyclin-dependant kinase
C-NHEJ : NHEJ classique
CSB : Cassure Simple Brin
GFP : Green Fluorescent Protein
HE : Homing Endonuclease
HR : Homologous Recombination
kb : kilobases
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
Mb : Mégabases
MMR : MisMatch Repair
NER : Nucleotide Excision Repair
NHEJ : Non Homologous End Joining
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : PolyEthylene Glycol
ROS : Reactive Oxygen Species
rpm : rotation par minute
SSA : Single Strand Annealing
Stop : codon de terminaison de la traduction (TAA, TAG ou TGA)
TALEN : Tanscription Activating-Like EndoNuclease
TBE : Tris Borate EDTA
TE : Tris EDTA
TGR : Targeted Gene Replacement
TI : Targeted Insertion
UTR : UnTranslated Region (région non traduite d'une séquence codante)
UV : Ultra-Violets
V : Volts
ZFN : Zinc Finger Nuclease

Nomenclature pour les gènes, les protéines et les mutants :

GENE, *PROTEINE* et *mutant*

Particularité pour *Saccharomyces cerevisiae* : *GENE*, Protéine et *mutant* (ou *mutant Δ*)

Pour *Physcomitrella patens* : *PpGENE*, *PpPROTEINE* et *Δmutant* pour le mutant de délétion.

Préambule

Une des façons de rendre un organisme végétal résistant à des agressions (pathogènes, facteurs environnementaux) ou d'améliorer le rendement d'une production est de modifier son information génétique. Lorsqu'on introduit un fragment d'ADN dans un génome végétal receveur (transgénèse), ce fragment s'intègre de façon aléatoire. Il peut donc perturber l'expression de gènes endogènes. Ce phénomène représente également une limite importante pour l'analyse fonctionnelle de gènes chez les plantes. Le ciblage génique permet d'éliminer ou de modifier de façon précise et spécifique un gène sans altérer le reste du génome. La maîtrise de cette technologie représente une étape critique pour réaliser une transgénèse mieux contrôlée et plus précise à la fois chez les plantes modèles et chez les plantes d'intérêt agronomique, un objectif majeur pour les biotechnologies.

Dans le cadre de mon projet EPHE, je me suis intéressée aux mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage génique chez l'espèce modèle *Physcomitrella patens*.

Dans mon introduction (**Chapitre 1**), je présenterai tout d'abord le modèle *Physcomitrella patens* (**I**) et la notion de ciblage génique (**II**). Le ciblage génique repose sur des mécanismes de réparation de l'ADN et notamment de recombinaison homologue, je décrirai donc les mécanismes de réparation de l'ADN (**III**) et je détaillerai plus précisément les protéines RAD51 (**IV**) et RAD1/RAD10 (**V**), qui sont impliquées dans ces mécanismes et sur lesquelles repose mon projet de recherche (**VI**).

Après avoir décrit les matériels et les méthodes utilisés dans le cadre de ce projet (**Chapitre 2**), je présenterai et analyserai les résultats obtenus (**Chapitre 3**). Ce chapitre est divisé en deux parties : la première partie concerne l'analyse fonctionnelle des protéines PpRAD51 (**I**) et la seconde partie concerne l'implication du complexe RAD1-RAD10 dans le ciblage génique (**II**). Je discuterai d'une façon plus globale les résultats obtenus lors de ce projet dans le **Chapitre 4**.

Chapitre 1 : Introduction

I. La mousse *Physcomitrella patens*

I. 1. *Physcomitrella patens*, plante modèle

La mousse *Physcomitrella patens* est une bryophyte, une plante terrestre qui ne dispose pas de vrai système vasculaire, qui est donc dépourvue de tissus conducteurs de la sève comme le xylème et le phloème. Les bryophytes, qui regroupent les hépatiques, les anthocérotes et les mousses, possèdent un ancêtre commun avec les plantes à fleurs. Les bryophytes occupent ainsi une position clé dans l'évolution des plantes, entre les algues vertes et les plantes à fleurs (Lang et al., 2008; Rensing et al., 2008).

Physcomitrella patens est un membre de la famille des Funariaceae, qui regroupe environ 300 espèces dans le monde (e.g. *Funaria hygrometrica*, *Entosthodon obtusus*, *Physcomitrium sphaericum*, *Pyramidula tetragona*, *Ceratodon purpureus* et *Physcomitrella patens*). Cette famille de plantes, très répandue dans les zones tempérées, se développe naturellement au bord des lacs et des rivières à la fin de l'été (jours longs). Les jours courts et une température inférieure à 18°C de l'automne induisent la formation des organes sexuels et le développement du sporophyte qui produira les spores durant l'hiver.

Physcomitrella patens, en tant que mousse, fait partie des espèces les plus proches phylogénétiquement des plantes vasculaires (Rensing et al., 2008). Elle possède la structure fondamentale de l'architecture d'une plante, avec un profil de développement relativement simple. Son métabolisme et son développement sont contrôlés par les mêmes facteurs biochimiques (auxine, cytokinine, strigolactones) que les plantes terrestres, et elle montre des réponses similaires aux stimuli environnementaux. Elle est ainsi utilisée depuis plusieurs années comme modèle de développement des végétaux concernant de nombreux processus biologiques comme la division et la croissance cellulaire, la croissance filamenteuse, la polarité cellulaire, la photomorphogenèse, le photo- et gravitropisme, la réponse aux hormones, et la transduction des différents signaux associés (Schaefer, 2002; Cove, 2005).

Le cycle de vie de *Physcomitrella patens* majoritairement haploïde et la taille relativement petite de son génome (480 Mb) rendent cette espèce très attractive pour les études génétiques. Par contre ce génome est réparti sur 27 chromosomes de petite taille, ce qui rend l'analyse cytogénétique difficile (Schaefer, 2002). Cette mousse possède un cycle de développement court, de 12 à 15 semaines en culture *in vitro*; elle possède des capacités régénératives permettant la culture de protoplastes et elle est facilement transformable. De plus la dominance du stade haploïde au cours du cycle permet l'identification rapide de phénotypes après mutagenèse. Enfin, le séquençage de son génome en 2008 ainsi que sa compétence pour le ciblage génique (intégration d'un fragment d'ADN exogène à un locus homologue par recombinaison) en font un modèle végétal particulièrement intéressant (Schaefer, 2001, 2002; Cove, 2005; Rensing et al., 2008).

I. 2. Le cycle de vie de *Physcomitrella patens*

Le cycle de vie de la mousse, comme celui des plantes à fleurs, présente l'alternance d'une phase haploïde (n) productrice de gamètes, assurée par le gamétophyte, et d'une phase diploïde (2n), productrice de spores, assurée par le sporophyte.

Le gamétophyte est dimorphique, il possède 2 stades de développement distincts : le protonema, correspondant au stade « juvénile » du gamétophyte ayant une croissance unidimensionnelle, et le gamétophyte, qui est le stade « adulte » du gamétophyte qui possède une croissance tridimensionnelle.

Le protonema résulte de la germination d'une spore haploïde et se caractérise par un réseau de cellules filamenteuses de type chloronema puis de type caulonema. Les chloronemas sont des filaments à croissance photo-dépendante lente contenant des cellules riches en chloroplastes, leurs parois intercellulaires sont perpendiculaires à l'axe d'élongation et ils possèdent un cycle cellulaire de 24h. Les chloronemas sont majoritairement bloqués en phase G2 du cycle cellulaire (phase de contrôle du matériel génétique et de préparation à la mitose) pendant la journée et effectuent leurs mitoses de façon synchrone la nuit (Reski, 1998). Ce sont les organes sources de la photosynthèse. A partir de ces cellules, s'effectue la transition vers les caulonemas, qui sont des filaments à croissance rapide et photo-indépendante contenant des cellules pauvres en chloroplastes, leurs parois intercellulaires sont obliques par rapport à l'axe et ils possèdent un cycle cellulaire de 8h. Les cellules de jeunes caulonemas sont plutôt en G1 (phase de croissance cellulaire et d'accumulation de matériel pour la synthèse d'ADN) et les vieilles cellules deviennent polyploïdes (Reski, 1998). Ce sont les organes puits de la photosynthèse.

Une cellule latérale, aussi appelée cellule initiale, se développe sur les caulonemas et peut se différencier en gamétophyte, ou tige feuillée, dans environ 4% des cas, après environ une dizaine de jours de culture. Le gamétophyte possède une croissance tridimensionnelle de type cauline, se différenciant à sa base en poils absorbants appelés rhizoïdes. Les organes sexuels mâles, les anthéridies, et les organes sexuels femelles, les archégonies, se développent à l'apex d'un même gamétophyte. C'est une espèce monoïque autogame. La gamétogenèse peut être induite par un traitement à 15°C et dure plusieurs semaines. Les gamètes mâles, les anthérozoïdes, se différencient au sein des anthéridies et sont mobiles. Ils vont fusionner par migration en milieu aqueux avec le gamète femelle, l'archégonie, pour former la première cellule diploïde du sporophyte, le sporogone. Ces derniers se différencient à leur tour, au sein des archégonies, pour former des capsules au sein desquelles la méiose peut produire jusqu'à 4000 spores haploïdes (Schaefer, 2002; Cove, 2005). La fécondation et la sporogenèse dure environ 2 à 3 mois.

Le mode d'élongation des protonemas (chloronemas et caulonemas) et des rhizoïdes est la croissance apicale, caractérisée par la sécrétion polarisée de composés pariétaux à l'apex de la cellule, couplée à une expansion cellulaire. La machinerie de la croissance apicale regroupant les filaments d'actine, la profiline (monomère d'actine), les formines (protéines interagissant avec la profiline) et les myosines, est essentielle chez *Physcomitrella patens* pour assurer le développement des filaments. La différenciation des chloronemas en caulonemas a lieu tout au long du protonema.

Cette transition est contrôlée par des facteurs environnementaux comme la lumière et les nutriments ainsi que par l'auxine (Vidali and Bezanilla, 2012).

I. 3. Multiplication végétative, régénération et transformation

Physcomitrella patens possède une capacité de régénération élevée. En effet, des fragments de tissus, qu'ils soient d'origine gamétophytique (protonema ou gamétophore) ou d'origine sporophytique (sporogone), régénèrent pour produire du tissu de type protonema. Ainsi le broyage mécanique de protonemas permet d'obtenir des fragments servant d'inoculum pour de nouvelles cultures. C'est la méthode de culture classiquement utilisée permettant la multiplication infinie de souches, y compris de mutants bloqués précocement dans leur cycle de développement.

La digestion enzymatique de jeunes protonemas (6-7 jours de culture à 25°C en jours longs) permet l'isolement d'un grand nombre de protoplastes. En routine, on peut obtenir jusqu'à 3 millions de protoplastes à partir d'une boîte de culture en milieu solide. Ces protoplastes constituent le matériel de départ pour la transformation. La méthode de transformation la plus utilisée est la perméabilisation des membranes des protoplastes par le PEG (PolyEthylène Glycol) et la mise en contact avec l'ADN transformant, la pénétration de ce dernier pouvant être facilitée par l'application d'un choc thermique. Les protoplastes se divisent dès 48h après leur isolement pour former des chloronemas. Leur taux de régénération en protonemas est variable, de l'ordre de 10 à 40%. Le taux de transformation, estimé par expression du gène rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein) apporté par l'ADN transformant, peut varier de 3 à 30% des protoplastes régénérants (Schaefer, 2002).

La multiplication végétative peut se faire aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide en Erlen ou en photo-bioréacteurs.

II. Le ciblage génique

Le ciblage génique est l'intégration d'un fragment d'ADN exogène partageant des homologies de séquences avec un génome receveur, au locus génomique correspondant. On parle alors d'intégration ciblée de façon opposée à l'intégration aléatoire (ou illégitime) qui se fait de façon non homologue. Le mécanisme moléculaire impliqué dans le ciblage génique est la recombinaison homologue. Chez la plupart des eucaryotes, la transformation génétique avec un fragment d'ADN exogène se fait majoritairement par intégration aléatoire (ou recombinaison illégitime). Il existe cependant quelques exceptions comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que la mousse *Physcomitrella patens*, dans lesquelles les intégrations se font préférentiellement de manière ciblée.

II. 1. Mise en évidence du ciblage génique

La notion de ciblage génique a été introduite à la fin des années 70 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, par la mise en évidence de recombinaison au locus en utilisant des fragments du gène cible dans un plasmide (Hinnen et al., 1978). La fréquence de ciblage se détermine par le ratio entre le nombre d'intégrations ciblées et le nombre total d'intégrations (aléatoires et ciblées) dans le génome, elle est de l'ordre de 95% chez cette levure. Cette efficacité a permis d'utiliser en routine le ciblage génique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est devenue un organisme modèle grâce à cet outil. Cette caractéristique n'est pas commune à toutes les levures, en effet, la levure *Schizosaccharomyces pombe* montre des fréquences de ciblage beaucoup plus faibles (Bähler et al., 1998; Krawchuk and Wahls, 1999).

Chez les vertébrés, même si plusieurs cas de ciblage génique ont été décrits, et notamment dans des lignées cellulaires humaines (Smithies et al., 1985), aucune espèce ne possède des fréquences de ciblage permettant son utilisation en routine en laboratoire. Il faut cependant noter que chez certains types cellulaires particuliers, le transgène peut s'intégrer par recombinaison homologue. C'est le cas des cellules souches de lignées cellulaires embryogènes pluripotentes (cellules ES) obtenues à partir de blastocystes de souris (Martin, 1981) qui permettent l'obtention de souris Knock-Out (KO) par recombinaison homologue, avec des fréquences de ciblage de 0,2 à 2% (Hasty et al., 1991). Un autre type cellulaire, la lignée cellulaire DT40, dérivée de lymphomes de poulet induits par le virus de la leucose aviaire, montre des fréquences élevées de ciblage génique (30%), cependant ces cellules différenciées ne permettent pas de générer un organisme (Winding and Berchtold, 2001).

Chez les plantes, des événements de ciblage génique ont pu être observés chez le tabac en ciblant le gène de résistance à la kanamycine de tabacs transgéniques (Paszkowski et al., 1988). Les fréquences de ciblage observées dans ces tabacs transgéniques varient de $5 \cdot 10^{-5}$ à $4 \cdot 10^{-4}$. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, des fréquences de ciblage de $3 \cdot 10^{-6}$ à $7 \cdot 10^{-5}$ ont été obtenues (Halfter et al., 1992). Des expériences de ciblage génique ont été également menées chez le maïs conduisant à des fréquences de ciblage de $3 \cdot 10^{-4}$ (Zhu et al., 1999) ainsi que chez le riz avec des fréquences similaires (Terada et al., 2002). On peut donc conclure que chez les plantes, comme chez les animaux, la fréquence de ciblage génique est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} .

Alors que chez les plantes à fleurs ces fréquences sont très faibles, la mousse *Physcomitrella patens* est une exception parmi les plantes et les eucaryotes supérieurs en général, puisqu'elle montre des fréquences d'intégrations ciblées similaires à celles observées chez la levure. Chez *Physcomitrella patens*, l'intégration ciblée est la voie préférentielle d'intégration d'un transgène présentant de l'homologie avec un locus génomique (Schaefer and Zýrd, 1997). Dans cette analyse phénotypique, génétique et moléculaire du ciblage de trois loci génomiques, les auteurs montrent pour la première fois chez les plantes, qu'un transgène peut s'intégrer de façon efficace par recombinaison homologue. La fréquence de transformation en conditions de ciblage est 10 fois supérieure à la fréquence d'intégration illégitime. Des fréquences très élevées, pouvant atteindre 90%, ont pu être observées (Schaefer, 2002). Depuis le séquençage du génome de *Physcomitrella patens* en 2008, cette mousse est devenue un remarquable outil pour la génétique inverse,

notamment grâce à sa compétence pour le ciblage génique qui permet d'obtenir des délétions ou des modifications précises pour un gène donné et ainsi d'en étudier la fonction (Rensing et al., 2008).

II. 2. Principe et applications

Dans des cellules compétentes pour le ciblage, lors de l'introduction d'une cassette de ciblage possédant deux régions homologues au locus cible encadrant un marqueur de sélection, il peut se produire deux événements de recombinaison homologue. Cela permet le remplacement de la région génomique ciblée par la cassette de ciblage.

Depuis sa mise en évidence vers la fin des années 1970, le ciblage génique est devenu l'une des techniques les plus utilisées pour l'étude fonctionnelle des gènes. Cette technique de génétique inverse permet d'une part d'étudier les conséquences phénotypiques de la perte de fonction d'un gène d'intérêt (Knock-Out) et d'autre part de réaliser des changements subtils et précis dans la séquence d'un gène (Knock-In), permettant un changement d'allèle ou une fusion traductionnelle avec un gène rapporteur comme la GFP.

Dans les deux cas, le marqueur de sélection peut être flanqué de deux sites spécifiques (sites Lox) permettant son excision sous l'action de la recombinaise Cre (Baubonis and Sauer, 1993; Sauer, 1998). Chez *Physcomitrella patens*, de nombreux outils de biologie moléculaire ont été développés comme le séquençage du génome permettant l'essor de la génétique inverse, un système rapporteur permettant de quantifier le ciblage génique, le système Cre/Lox ou encore des systèmes d'expression conditionnelle (Schaefer, 2002; Reski and Cove, 2004; Rensing et al., 2008).

Le ciblage génique présente un intérêt majeur pour les industries pharmaceutiques et agro-alimentaires ainsi que pour la recherche en biologie fondamentale et appliquée à la médecine. Ainsi, les applications du ciblage génique sont nombreuses et peuvent être de plusieurs types. D'une part, cela permet de réaliser des analyses fonctionnelles de nombreux gènes impliqués dans différents processus biologiques, en étudiant l'effet de la délétion totale ou partielle d'un gène donné. On peut ainsi obtenir des lignées cellulaires mutantes ou des organismes modèles pour étudier ces processus. D'autre part, ces techniques permettent de réaliser de façon très précise des modifications ponctuelles dans un gène et sont utilisées pour remplacer un allèle (pour la thérapie génique par exemple), ou changer les propriétés d'une enzyme (rendre les modifications post traductionnelles d'une protéine recombinante moins allergisantes, par exemple). Ainsi, des souches de *Physcomitrella patens* possédant un profil de N-glycosylation « humanisée » non immunogène ont été obtenues par ciblage génique et sont utilisées pour la production de médicaments (Decker and Reski, 2008). Dans ce cadre de production de protéines recombinantes pharmaceutiques dans un système hétérologue, on peut également citer un exemple récent de bio-médicament produit dans *Physcomitrella patens*, le Facteur H, une protéine du sérum humain, qui représente une approche thérapeutique prometteuse pour des patients atteints de dysfonctionnement du rein et de la rétine (Büttner-Mainik et al., 2011).

II. 3. Facteurs influençant la fréquence de ciblage

La faible efficacité de ciblage génique observée chez la majorité des espèces a motivé de nombreuses études visant à modifier les facteurs pouvant influencer et éventuellement favoriser le ciblage génique.

II. 3. 1. La longueur des zones d'homologie

Chez la levure, l'efficacité de ciblage dépend de la longueur de l'homologie. En effet, si des zones d'homologies de 35 pb de part et d'autre du marqueur de sélection suffisent pour cibler un gène avec une efficacité de 54% (Baudin et al., 1993), des fréquences supérieures à 80% sont obtenues pour des homologies de 45 à 90 pb, alors que les fréquences chutent aux alentours de 4% pour des homologies de 15 à 25 pb (Manivasakam et al., 1995).

De la même façon chez *Physcomitrella patens*, il existe également une relation directe entre la longueur des zones d'homologies et la fréquence de ciblage. Pour un même locus, une fréquence de 90% peut être obtenue avec des homologies de 1 kb tandis que des zones d'homologies de 400 pb suffisent pour atteindre une fréquence de ciblage génique de 50% (Kamisugi et al., 2005).

II. 3. 2. Le locus à cibler

La fréquence de ciblage génique peut varier d'un locus à l'autre au sein d'une même espèce. Par exemple, chez *Physcomitrella patens*, l'analyse de plusieurs locus génomiques illustre cette variation (Kamisugi et al., 2005). En effet, des homologies de 900 pb permettent d'atteindre une fréquence de ciblage de 84% pour le locus *PpRac1* alors que la fréquence de ciblage du locus *PpPum* n'est que de 39% pour des homologies de 1200 pb. Cela pourrait notamment s'expliquer par la différence d'accessibilité de la chromatine au niveau du locus ciblé. Des études récentes chez *Saccharomyces cerevisiae* ont d'ailleurs montré que l'efficacité de transformation était inversement corrélée avec la densité en nucléosomes (Aslankoochi et al., 2012). Les nucléosomes constituent l'unité de base de condensation de la chromatine dans laquelle l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones. Ce sont des structures très condensées bloquant l'accessibilité de l'ADN. Leur localisation n'est pas aléatoire sur l'ADN et leur présence peut diminuer l'accessibilité de l'ADN pour l'intégration d'un transgène. D'ailleurs, les complexes protéiques de remodelage de la chromatine qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes sont également impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN en permettant la décondensation de l'ADN afin de faciliter le chargement de la machinerie de réparation (Bao and Shen, 2007).

II. 3. 3. Le type cellulaire

Comme décrit précédemment, dans certains types cellulaires particuliers de vertébrés, comme les cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES), les cellules DT40 de poulet, ou encore les cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO), le transgène peut s'intégrer par recombinaison homologue même si ces événements restent minoritaires. Dans le cas de *Physcomitrella patens*, deux hypothèses ont été avancées pour expliquer le fort taux de ciblage génique. La première hypothèse est basée sur le fait que les protoplastes, issus de chloronemas, sont majoritairement bloqués en phase G2 et ce blocage favoriserait la recombinaison homologue (Reski, 1998). La seconde hypothèse, qui pourrait être liée à la première, fait intervenir la

dominance du stade haploïde dans le développement de la mousse qui pourrait expliquer la nécessité d'une machinerie de recombinaison homologue efficace pour éviter les mutations délétères (Schaefer, 2002).

II. 3. 4. Importance d'une cassure double brin (CDB)

L'introduction d'une CDB dans la zone d'homologie de l'ADN transformant chez la levure (Orr-Weaver et al., 1981) et chez les champignons filamenteux comme *Aspergillus nidulans* (Bird and Bradshaw, 1997) a permis d'augmenter considérablement la fréquence de ciblage. Chez la Drosophile, le ciblage par recombinaison homologue a été facilité par une technique sophistiquée développée par Rong et Golic. Cette technique est basée sur l'expression nucléaire d'une recombinase spécifique et d'une endonucléase spécifique qui permettent la libération et la linéarisation du vecteur de ciblage dans le noyau (Rong and Golic, 2000; Rong et al., 2002). Chez le tabac, l'induction d'une CDB dans une séquence intégrée dans le génome permet d'augmenter de 10 à 100 fois l'efficacité de ciblage (Puchta et al., 1996). Plus récemment, un système de ciblage génique *in planta* a été développé chez *Arabidopsis thaliana*, reposant sur l'expression d'une enzyme qui coupe spécifiquement la cible chromosomique et le locus donneur chromosomique libérant ainsi la matrice de ciblage. Des fréquences de ciblage de 1% ont ainsi pu être observées chez cette plante (Fauser et al., 2012).

Afin de favoriser la recombinaison homologue, notamment dans les cellules de mammifères et de plantes, différents systèmes de nucléases dirigées (ou SDN pour Site Directed Nucleases) ont été développés pour introduire des CDB à des sites chromosomiques spécifiques du locus à cibler (Pâques and Duchateau, 2007; Sun et al., 2012; Wirt and Porteus, 2012).

Parmi ces SDN, on peut citer les méganucléases, qui sont des endonucléases spécifiques d'un locus donné, comme I-CreI et I-SceI, découvertes dans les années 1980 (Kostriken et al., 1983; Jacquier and Dujon, 1985). L'induction de CDB par ces endonucléases a permis d'augmenter le ciblage génique d'un facteur 100 chez la souris (Smith et al., 1995; Gouble et al., 2006) et les plantes (Puchta et al., 1996; Fauser et al., 2012). Chez l'homme, l'endonucléase I-CreI modifiée permet de cibler des gènes humains afin de corriger les mutations impliquées dans des maladies mono-géniques (Arnould et al., 2006, 2011). Les nucléases à doigt de zinc (ZFN pour Zinc Finger Nuclease) sont des nucléases artificielles résultant de la fusion de domaines de liaison ZF (Zinc Finger) et du domaine de coupure de l'endonucléase FokI. Chez les animaux, des fréquences de ciblage de 1,7 à 4,5% ont été atteintes dans des zygotes (embryons unicellulaires) de souris en utilisant des nucléases ZFN (Meyer et al., 2010). Leur utilisation a également permis d'augmenter le ciblage génique dans des cellules humaines en culture (Urnov et al., 2005; Porteus et al., 2006) et chez les plantes (Lloyd et al., 2005; Zhang et al., 2010). Plus récemment, le système des TALEN a été développé. Il repose sur la fusion de protéines agissant comme un activateur de transcription (TAL pour Transcription Activating-Like), domaine de liaison à l'ADN, et d'un domaine de coupure FokI. Une étude récente montre que l'utilisation de TALEN permet de cibler des modifications génomiques avec une fréquence de 30% et d'atteindre des fréquences de ciblage génique de 4 à 14% dans des protoplastes de tabac (Zhang et al., 2012).

Chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Physcomitrella patens*, l'obtention de fréquences élevées de ciblage génique est liée à la linéarisation de la cassette de ciblage. On peut supposer que ce sont les CDB aux extrémités qui sont alors prises en charge par des mécanismes de réparation de l'ADN.

II. 3. 5. Choix du mécanisme de réparation des CDB

Les cellules ont développé une panoplie de mécanismes de réparation des CDB (voir **III**). L'intégration d'un ADN transformant dans un génome receveur se fait en utilisant les processus de réparation des CDB. Il existe trois mécanismes majoritaires de réparation des CDB : la recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination), le raboutage des extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End Joining) et la réparation par micro-homologies (SSA : Single Strand Annealing). Alors que certaines bactéries (comme *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pneumoniae*) et certaines levures (principalement *Saccharomyces cerevisiae*) privilégient l'utilisation de séquences homologues (voie HR) pour réparer les CDB chromosomiques et intégrer un ADN exogène (Debowski et al., 2012), chez la majorité des eucaryotes l'intégration illégitime est privilégiée, qu'elle se fasse par micro-homologies (voie SSA) ou religation des extrémités (voie NHEJ). La capacité de ciblage génique serait donc directement liée au choix de la voie de réparation des CDB. Dans le chapitre suivant, je vais présenter les mécanismes de réparation de l'ADN et plus particulièrement ceux concernant la réparation des CDB.

III. Les mécanismes de réparation de l'ADN

Afin d'assurer l'intégrité du génome et sa transmission, il est indispensable pour la cellule de disposer de mécanismes lui permettant de contrôler d'une part la stabilité du génome (réparation) et d'autre part la plasticité du génome (variabilité génétique).

III. 1. Les dommages à l'ADN

L'ADN d'une cellule est continuellement exposé à une multitude de dommages endogènes et exogènes. Parmi les agents endogènes, on peut citer les radicaux libres dérivés de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), générés par le métabolisme cellulaire pouvant oxyder les bases de l'ADN et causer des cassures, ainsi que les erreurs produites lors de la réplication de l'ADN suite à une mauvaise incorporation de nucléotides. De plus, la recombinaison méiotique ainsi que la recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobulines génèrent également des cassures induites de l'ADN, nécessaires pour assurer la ségrégation des chromosomes et la variabilité génétique d'une part, et augmenter la réponse immunitaire d'autre part. Les dommages exogènes peuvent être causés par des agents chimiques (produits chimiques industriels, médicaments utilisés en chimiothérapie) et par des agents physiques (rayonnements ionisants et Ultra-Violet (UV)).

On estime le nombre de lésions de l'ADN entre 10^3 et 10^6 par cellule par jour (Hoeijmakers, 2009; Lord and Ashworth, 2012), ce qui représente chez un homme adulte sain de 10^{16} à 10^{18} événements de réparation par jour (Freiberg et al., 2006). Ces lésions peuvent être de différents

types : des modifications de base (oxydations, alkylations), des cassures simple brin (CSB) et des cassures double brin (CDB). Des lésions non réparées peuvent interférer avec la réplication de l'ADN ou la transcription, conduire à des mutations et des pathologies (notamment les cancers) ou à la mort de la cellule (Ciccia and Elledge, 2010; Lord and Ashworth, 2012).

Afin d'assurer le maintien de l'intégrité du génome au cours du cycle cellulaire, des points de contrôle, « G1/S » pour la transition vers la réplication et « G2/M » pour la transition vers la mitose, permettent à la cellule de détecter les éventuels dommages. Ces contrôles qui permettent ou non la poursuite du cycle cellulaire sont réalisés par des complexes Cycline/Cdk (cyclin-dépendant kinase). Il est donc crucial pour la cellule de réparer de façon appropriée et efficace ces différentes lésions en utilisant plusieurs mécanismes adaptés (voir III. 2).

III. 2. La réponse aux dommages de l'ADN

Le système de réparation de l'ADN est un processus très complexe qui fait intervenir un très grand nombre de gènes : en 2011, 168 gènes humains impliqués dans la réparation étaient identifiés (Wood et al., 2011). Ces outils de réparation doivent être très finement contrôlés pour maintenir l'intégrité du génome d'un individu : il faut réparer les lésions sans infliger d'autres dégâts. Des déficiences dans les voies de réparation peuvent avoir des conséquences préjudiciables pour un organisme. Ainsi, chez l'homme, des mutations dans ces gènes affectent l'homéostasie des systèmes nerveux et immuns et peuvent conduire à un vieillissement prématuré et à des prédispositions à des cancers (Jackson and Bartek, 2009).

Face à la variété et à la fréquence des lésions de l'ADN, les cellules ont développé une panoplie de mécanismes de réparation qui constituent la réponse aux dommages de l'ADN : la voie MMR (MisMatch Repair), les voies NER/BER (Nucleotide Excision Repair/Base Excision Repair), la voie NHEJ (Non-Homologous-End-Joining), la voie SSA (Single Strand Annealing) et la voie HR (Homologous Recombination). La réponse aux dommages de l'ADN est une voie complexe de transduction du signal qui a la capacité de détecter les lésions de l'ADN et de transmettre cette information à la cellule pour influencer sur la réponse cellulaire à ces lésions, en permettant le recrutement des facteurs appropriés au bon endroit et au bon moment. Cette réponse se fait en 3 étapes coordonnées : la détection de la lésion par des protéines « capteurs », la signalisation qui fait intervenir les médiateurs et les transducteurs de signal, et finalement la réponse proprement dite, c'est-à-dire la réparation physique de la lésion par les protéines « effecteurs ». Parmi ces détecteurs de dommages, on peut citer les ADN glycosylases, la PARP-1 (PolyADP ribose polymérase 1), le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) nommé MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) chez la levure, les kinases ATM (Tel1 chez la levure) et ATR (ou Mec1) ainsi que la protéine RPA (Replication Protein A). La détection d'une lésion déclenche l'accumulation de facteurs (les médiateurs) qui vont permettre l'arrêt du cycle cellulaire, puis la réparation ou la mort cellulaire par les protéines effectrices. Les kinases ATM/Tel1 et ATR/Mec1 peuvent phosphoryler à la fois les médiateurs et les effecteurs. Le facteur de transcription p53, surnommé « gardien du génome » joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome : des mutations de p53 sont observées dans plus de la moitié des cancers humains. En effet, son activation permet d'une part de bloquer le cycle cellulaire et d'autre part de déclencher l'accumulation de facteurs de réparation ou d'apoptose.

La nature des lésions de l'ADN conditionne la voie de réparation que la cellule va mettre en place puisqu'elles mobilisent des protéines de détections spécifiques. On peut distinguer plusieurs voies principales de réparation de l'ADN. Pour la réparation des modifications de bases et des cassures simple brin (CSB), trois voies de réparations sont impliquées : la voie NER, la voie BER et la voie MMR. Pour la réparation des cassures double brin (CDB), trois autres voies de réparations sont impliquées : la voie NHEJ, la voie HR et la voie SSA.

La cassette de ciblage utilisée lorsque l'on souhaite éliminer ou modifier un gène est un fragment d'ADN linéaire qui porte deux CDB à ses extrémités. Lors de l'introduction de cette cassette dans la cellule, ce sont donc les mécanismes de réparation des CDB qui sont impliqués dans l'intégration de ce transgène. Je développerai donc particulièrement les mécanismes de réparation des CDB.

III. 3. La réparation des cassures double brin (CDB)

Les cassures double brin sont produites par des agents génotoxiques exogènes (rayonnements ionisants et agents mutagènes) mais aussi par des événements endogènes tels que le blocage des fourches de réplication ou lors de processus biologiques générateurs de diversité, comme la méiose et la recombinaison des gènes d'immunoglobuline. La cassure double-brin de l'ADN est une lésion particulière qui se trouve au centre de l'équilibre stabilité/variabilité du génome. Ces cassures constituent la forme la plus toxique des lésions de l'ADN, puisqu'elles peuvent provoquer la mort de la cellule si elles ne sont pas réparées et leur mauvaise réparation peut engendrer une instabilité génomique ou des translocations. Pour empêcher cela, les cellules ont développé plusieurs mécanismes de réparation des CDB. Après détection d'une cassure double brin, plusieurs mécanismes de réparation indépendants peuvent être mis en œuvre par la cellule : la voie NHEJ classique (ou C-NHEJ), la voie NHEJ alternative (ou A-NHEJ), la voie SSA et la voie HR. Pendant longtemps, on ne parlait que d'un seul type de NHEJ, appelé maintenant NHEJ classique, qui est le mécanisme prédominant et qui est plutôt conservatif. Mais des études récentes ont mis en évidence un autre type de NHEJ, le NHEJ alternatif qui lui, est mutagène (Ma et al., 2003; Guirouilh-Barbat et al., 2004; Mladenov and Iliakis, 2011). Le choix entre ces voies dépend de la phase du cycle cellulaire et du recrutement des premiers facteurs sur la cassure.

III. 3. 1. Le choix de la voie de réparation

Après détection d'une CDB, le choix entre les deux mécanismes majeurs de réparation (C-NHEJ et HR) repose sur la phase du cycle cellulaire pendant laquelle s'est produite la CDB ainsi que le traitement des extrémités de la cassure. Pour résumer, le NHEJ fonctionne tout au long du cycle cellulaire mais il est favorisé en G1 et la HR est limitée à la fin de la phase S et à la phase G2, après réplication du génome lorsqu'une chromatide sœur est disponible pour servir de matrice de réparation (Takata et al., 1998).

D'une part, ces deux mécanismes sont essentiels comme le suggère la létalité de certains mutants KO d'une des deux voies (*rad51* ou *brca2* pour la HR et *ligase IV* ou *xrcc4* pour le NHEJ) chez certaines espèces comme la souris par exemple (Kass and Jasin, 2010). Par ailleurs, l'analyse de double mutants affectant les deux voies, a mis en évidence la combinaison des voies HR et

NHEJ chez la souris (doubles mutants *rad54-ku80*) ainsi que dans les cellules de poulet (double mutants *rad54-ku70*). En effet, ces doubles mutants montrent un sévère défaut de réparation se traduisant par une hyper-radiosensibilité par rapport aux simples mutants (Fukushima et al., 2001; Couëdel et al., 2004). D'autre part, il existe également une compétition entre les deux mécanismes, puisque chez des mutants du NHEJ (mutants *ku*) de levure qui montrent une augmentation de la résection des extrémités, on observe une augmentation de la HR et du SSA (Lee et al., 1998). De la même manière, chez *Neurospora crassa*, on observe une augmentation de la HR (et de l'efficacité de ciblage génique associée) chez des mutants *ku70* ou *ku80* (Ninomiya et al., 2004).

Le choix entre réparation par NHEJ ou par HR est régulé par les kinases dépendantes des cyclines, les CDK, et donc influencé par le stade du cycle cellulaire. Chez la levure, l'activité CDK est nécessaire pour la résection des extrémités et donc pour la HR pendant la transition S/G2 (Aylon and Kupiec, 2004; Ira et al., 2004). La fixation des protéines Ku70 et Ku80 sur l'ADN protégerait ce dernier de la résection, favorisant le NHEJ. Et inversement, la résection des extrémités d'une CDB empêcherait la fixation des protéines Ku, favorisant la HR, le SSA ou le NHEJ alternatif (Symington and Gautier, 2011). On peut noter que le stade de développement joue un rôle dans ce choix, en effet la HR est favorisée dans les cellules souches embryonnaires de souris alors que le NHEJ est favorisé chez les souris adultes (Essers et al., 2000).

III. 3. 2. La voie NHEJ (Non Homologous End Joining) classique

La voie NHEJ a longtemps été considérée comme mutagène mais serait en fait plutôt conservative (Feldmann et al., 2000; Rass et al., 2009). Le mécanisme de NHEJ repose sur la ligation directe des extrémités non homologues d'une CDB, pouvant être source de délétions ou de mutations autour de la cassure. C'est un mécanisme simple, rapidement mis en place par la cellule mais qui est peut se révéler dans certains cas non fidèle. Ce mécanisme a lieu tout au long du cycle cellulaire mais il est particulièrement favorisé en phase G1. Ce mécanisme qui ne nécessite pas de résection des extrémités et qui dépend des protéines Ku et Lig4 est appelé NHEJ classique, ou C-NHEJ. Les acteurs principaux du C-NHEJ sont les protéines Ku70 et Ku80, qui forment un hétérodimère qui se fixe sur les extrémités d'une CDB reconnues par le complexe MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), et le complexe Ligase (Ligase4 et ses co-facteurs) qui permet le raboutage des extrémités.

Le C-NHEJ est le mécanisme dominant de réparation chez les mammifères et chez les plantes, il est moins important chez la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le complexe MRX stimule la réaction de ligation par le complexe Ligase *in vitro* (Chen et al., 2001). Dans le C-NHEJ, le complexe MRX aurait un rôle structural permettant de maintenir les deux extrémités proches l'une de l'autre (Rass et al., 2012). Chez les eucaryotes, l'initiation du C-NHEJ est la reconnaissance d'une CDB par le complexe hétérodimérique Ku70/Ku80 qui forme un anneau asymétrique et qui assure la stabilisation des extrémités et empêche leur dégradation. Chez les mammifères, ce complexe se lie à la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN, la DNA-PKcs, lui conférant son activité kinase. Cette fixation conduit au recrutement du complexe de ligation comprenant la Lig4/LigaseIV et ses co-facteurs, Lif1/XRCC4 et Lif2/XLF. Le complexe Ku-Ligase peut recruter d'autres facteurs du C-NHEJ (des nucléases et des polymérases) permettant de retraiter ces extrémités avant de les religuer. Il semblerait que le C-NHEJ fonctionne

par plusieurs essais de ligation et traitement des extrémités. Le C-NHEJ est un mécanisme très dynamique qui permet la réparation rapide et plutôt conservative de la cassure double brin, avec d'éventuelles délétions (Pardo et al., 2009; Ciccio and Elledge, 2010).

Il existe également un mécanisme de religation des extrémités indépendant des protéines Ku et Lig4, le NHEJ alternatif (alt-NHEJ ou A-NHEJ).

III. 3. 3. La voie NHEJ alternative

Chez la levure, des évènements rares de raboutage des extrémités indépendants des protéines Ku ont mis en évidence une voie alternative de NHEJ (Ma et al., 2003). Chez les cellules de mammifères, des CDB sont raboutées même lorsqu'il y a blocage de facteurs clés du NHEJ, comme les protéines DNA-PKcs, KU70, KU80, LigaseIV et XRCC4 (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Mladenov and Iliakis, 2011). Cela suggère l'existence d'une voie alternative du NHEJ, le NHEJ alternatif (A-NHEJ), qui est aussi appelée B-NHEJ pour Back-up NHEJ ou MMEJ pour Microhomology Mediated End-Joining. Cette voie utiliserait la détection de CDB par la protéine PARP1 et le complexe MRX, qui permet la résection initiale des extrémités de la cassure. Alors que ce complexe avait un rôle structural dans la voie C-NHEJ, il possède une activité nucléase dans les voies A-NHEJ, SSA et HR. Dans la voie A-NHEJ, cette résection limitée permet de découvrir des zones d'ADN complémentaires distantes de la cassure pouvant s'hybrider. Cette hybridation de micro-homologies (5 à 25 nucléotides) est ensuite prise en charge par la ligase Lig3/LIGIII et la protéine XRCC1. La résolution de l'intermédiaire puis la ligation des extrémités conduisent inévitablement à des délétions à la jonction, ce mécanisme est donc plus mutagène que le C-NHEJ (Cheng et al., 2011; Mladenov and Iliakis, 2011; Simsek et al., 2011). D'ailleurs, l'analyse des translocations observées dans différentes tumeurs montrent l'utilisation de micro-homologies pour la religation, suggérant que ces translocations ont été générées par A-NHEJ et non par C-NHEJ (Stephens et al., 2009).

Chez les plantes, une voie de religation indépendante des protéines Ku et Lig4 a aussi été mise en évidence et impliquerait AtLig1 et AtXRCC1 (Waterworth et al., 2009, 2011; Charbonnel et al., 2011).

L'implication de ces différentes voies dans l'apparition de mutations après réparation de cassure double brin reste encore à préciser, mais il semble maintenant clair que le C-NHEJ n'est pas forcément non fidèle.

III. 3. 4. La voie SSA

A la différence de la voie C-NHEJ qui ne nécessite pas de résection des extrémités et de la voie A-NHEJ qui dépend d'une résection limitée, la voie SSA et la voie HR sont initiées par la résection extensive des extrémités initialement traitées par le complexe MRX-Sae2. La résection représentant un risque d'instabilité génétique, elle est donc finement régulée. Elle est favorisée pendant la phase S du cycle cellulaire, afin de permettre la recombinaison homologue nécessaire au redémarrage des fourches de réplication bloquées, ainsi qu'en phase G2 lorsqu'une matrice homologue est disponible.

Cette résection se fait en 2 étapes successives après perte des protéines Ku70-Ku80 aux extrémités de la CDB. Des études génétiques chez *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que la résection initiale était assurée par le complexe MRX-Sae2, la dégradation 5'-3' étant réalisée par la protéine Mre11 et la protéine Sae2. Cela génère des extrémités simple brin, qui sont des substrats pour l'hélicase Sgs1-Dna2 qui facilite la résection extensive par l'exonucléase Exo1 (Mimitou and Symington, 2009, 2011). Cette résection et la formation d'une extrémité 3' simple brin conduisent à la fixation de la protéine RPA (Replication Protein A) qui permet de stabiliser ces extrémités. En présence de séquences répétées d'ADN, l'hybridation des zones homologues va être catalysée par le médiateur de recombinaison Rad52 et son homologue Rad59 (Bai and Symington, 1996; Motycka et al., 2004). La longueur de ces homologues (séquences répétées) doit être de plus de 30 pb et la réparation est plus efficace avec des longueurs de 200 à 400 pb (Sugawara et al., 2000). Cette hybridation conduit au recrutement du complexe endonucléase structure spécifique Rad1-Rad10 qui clive les queues simple brin non homologues. Ces endonucléases à structure spécifiques finalisent la réparation d'une CDB en éliminant les séquences hétérologues entre ces séquences répétées.

La voie SSA n'est donc pas une voie de réparation fidèle mais elle est dirigée par l'homologie.

Lorsque la cellule dispose d'une chromatide sœur (en phase S et en phase G2 du cycle cellulaire), il y a formation du nucléofilament Rad51 qui permet l'invasion du brin et la recombinaison homologue.

III. 3. 5. La voie HR

La recombinaison homologue consiste en l'échange de séquences entre molécules d'ADN homologues. Elle est importante pendant la mitose et la méiose. Au cours de la mitose, la recombinaison homologue est initiée par les CDB fortuites provoquées par des agents exogènes ou par le blocage des fourches de réplication. Elle permet la réparation sur la chromatide sœur ainsi que le redémarrage de la réplication. La recombinaison homologue mitotique, qui repose sur l'action de la recombinase Rad51, maintient la stabilité génomique et prévient la tumorigenèse (Moynahan and Jasin, 2010). Lors de la méiose, la ségrégation correcte des chromosomes homologues paternels et maternels en première division est assurée par la recombinaison homologue, qui est initiée par la formation programmée de CDB catalysées par la topoisomérase SPO11 (Bergerat et al., 1997). La recombinaison homologue permet en effet d'établir un lien physique (appelé crossing-over) entre deux chromosomes homologues (appelés aussi bivalents). Elle permet également l'échange d'information entre les allèles paternels et maternels d'un individu, assurant la diversité génétique de la descendance. A la différence de la mitose, deux recombinases sont présentes en méiose chez la plupart des eucaryotes : Rad51 et Dmc1.

Beaucoup de gènes de la voie HR ont été identifiés par l'isolement de mutants de levure hypersensibles aux agents mutagènes causant des CDB et montrant une défaillance à produire des gamètes viables. Ces gènes sont connus sous le nom de gènes du groupe d'épistasie de *RAD52* : *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54*, *MRE11* et *XRS2* (Symington, 2002; San Filippo et al., 2008). Le mutant *rad52* a été le premier mutant isolé et montre le

phénotype le plus marqué parmi ce groupe de mutants, même lorsqu'ils sont combinés dans des double mutants (Schiestl et al., 1994).

La réparation par HR se fait en 3 étapes : la résection des extrémités 5', l'invasion d'une CDB par le simple brin pour former un hétéroduplex, et finalement la résolution des intermédiaires générés. La première étape de résection qui est commune avec la voie SSA a été décrite dans le paragraphe précédent. Après fixation du complexe MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) sur les extrémités de la cassure et leur résection, les extrémités simple brin sont traitées par l'exonucléase Exo1 ou le complexe Sgs1-Dna2. Le recrutement de la protéine RPA stabilise les extrémités simple brin et permet, lorsqu'une chromatide sœur est disponible, en phase S ou G2 du cycle cellulaire, le chargement de la recombinase Rad51 sur l'ADN au site de la cassure. La polymérisation de Rad51 sur l'ADN simple brin conduit à la formation du nucléofilament ou filament présynaptique de recombinaison. Ce dernier est stabilisé par les médiateurs de recombinaison (Rad52, Rad54 et Rad55-Rad57) et il stimule l'invasion de brin et la recherche d'homologie conduisant à la formation d'une boucle. Cette boucle peut être rapidement résolue après synthèse d'ADN par retour du brin envahissant, produisant des non crossing-over (modèle SDSA pour Synthesis Dependant Strand Annealing). Lorsque cette boucle est stabilisée par la capture d'une seconde extrémité conduisant à la formation d'une double jonction de Holliday, des endonucléases particulières, les résolvas, permettront la résolution de ces jonctions produisant soit un crossing-over soit un non crossing-over en fonction de la combinaison des coupures (modèle DSBR pour Double Strand Break Repair) (Chapman et al., 2012).

La recombinaison homologue est un mécanisme fidèle si la matrice utilisée est identique à la copie originale. En effet, lorsque la réparation se fait sur la chromatide sœur, elle est génétiquement silencieuse car la matrice est identique. Ce mécanisme est indispensable pour assurer la stabilité du génome mais il doit être contrôlé car il peut se révéler délétère. Ainsi, si la matrice est le chromosome homologue (cellule diploïde), la réparation peut conduire à une perte d'hétérozygotie des marqueurs parentaux qui peut être délétère (Moynahan and Jasin, 2010). Un excès de recombinaison homologue peut également conduire à une instabilité génomique comme des mutations locales, des réarrangements chromosomiques pouvant entraîner l'amplification ou la délétion de gènes (Stankiewicz and Lupski, 2002). Les processus de la voie HR sont contrôlés temporellement par les régulateurs du cycle cellulaire, les kinases cycline-dépendantes ou CDK (Ira et al., 2004). Ce mécanisme est donc très régulé et implique un grand nombre de facteurs. Parmi ces facteurs, on trouve non seulement les protéines codées par les gènes du groupe d'épistasie de *RAD52* (Krogh and Symington, 2004) mais également des ADN polymérases pour la synthèse d'ADN, des nucléases pour la résection (comme Exo1, Sae2), des hélicases pour dérouler la double hélice d'ADN (comme Sgs1, Srs2, Dna2), des topo-isomérases pour relâcher les contraintes de torsion de l'ADN, des résolvas pour cliver les jonctions de Holliday (Mus81, Slx1-Slx4) ainsi que des ligases.

III. 4. Les protéines de réparation des CDB chez *Physcomitrella patens*

Par homologie de séquences avec les protéines de levure ou d'origine humaine, un certain nombre d'orthologues a pu être identifié parmi les protéines prédites chez *Physcomitrella patens*.

En ce qui concerne la voie NHEJ, les protéines KU70, KU80 et Ligase IV sont présentes chez la mousse. Pour la voie SSA, les protéines RAD1 et RAD10 sont également retrouvées, et en ce qui concerne la voie HR, les protéines du complexe MRX (MRE11, RAD50 et XRS2), ainsi que les protéines RAD51, RAD52, RAD54, RAD51B, RAD51C, RAD51D et XRCC2 sont présentes chez *Physcomitrella patens*. Les hélicases SGS1 et SRS2 ainsi que les résolvases MUS81, SLX, SLX4 et GEN1 sont également conservées chez la mousse.

III. 5. Les mécanismes impliqués dans le ciblage génique

Afin d'expliquer les mécanismes d'intégration d'une cassette de ciblage au locus homologue dans le génome receveur, deux modèles ont été proposés selon qu'il y ait invasion d'un brin ou des deux brins de la cassette.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'analyse moléculaire des cellules filles produites par division des transformants a montré la présence des polymorphismes apportés par l'ADN de ciblage) dans toutes les cellules possédant le marqueur de sélection. Dans la cellule parentale, ces polymorphismes étaient donc présents sur les deux brins (en *trans*), ce qui correspond à deux événements de recombinaison homologue, et non sur le même brin. Cela conduit au remplacement du gène ciblé par le marqueur de sélection. Ce modèle correspond à celui qui avait été proposé dans une lignée cellulaire cancéreuse de souris (Li and Read, 2001; Langston and Symington, 2004). Ces résultats montrent que chez *Saccharomyces cerevisiae*, le ciblage génique est initié par deux invasions de brins indépendantes.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la totalité des événements ciblés résulte d'une double recombinaison homologue entre les deux extrémités de la cassette de ciblage et les deux locus génomiques, conduisant à des remplacements de gène par le marqueur de sélection (ou TGR pour Targeted Gene Replacement).

Chez *Physcomitrella patens*, on retrouve les mêmes remplacements de gène résultant de deux événements de HR, mais on observe également un autre type d'événements ciblés : les insertions ciblées (TI pour Targeted Insertion). Ces insertions ciblées sont le résultat de l'intégration à une extrémité du locus ciblé par recombinaison homologue accompagné, à l'autre extrémité, de ce qui apparaît comme un événement d'intégration de type non homologue. Dans ce cas, il y a remplacement d'une partie du gène « abc » par le marqueur de sélection et conservation du gène « a'bc », « a' » représentant la région « a » plus ou moins tronquée. Si la recombinaison a lieu en 3', on parle alors d'insertion ciblée 3' (Kamisugi et al., 2006). Le mécanisme aboutissant à ces TI n'est toujours pas complètement élucidé.

IV. La protéine RAD51, un élément clé de la Recombinaison Homologue

La recombinaison homologue est donc au centre des mécanismes impliqués dans le ciblage génique. Au cours de mon projet, je me suis intéressée à la protéine RAD51 qui par son activité recombinase permet l'échange de brin entre deux molécules d'ADN et qui est donc un facteur essentiel pour le ciblage génique.

Chez *Escherichia coli*, la protéine RecA est l'élément central de la recombinaison homologue. Son activité de liaison à l'ADN simple brin (ADN sb) en présence d'ATP permet la formation d'un nucléofilament hélicoïdal essentiel pour la réparation et la recombinaison (Roberts et al., 1978; Kowalczykowski et al., 1994; Shinohara and Ogawa, 1999). Chez les eucaryotes, plusieurs gènes *RecA*-like ont été identifiés : *RAD51*, *DMC1* et les paralogues de *RAD51*. Deux protéines sont impliquées dans l'invasion de brin nécessaire au mécanisme de recombinaison homologue : ce sont les recombinases RAD51 et DMC1. La protéine RAD51 est exprimée à la fois en mitose et en méiose alors que la protéine DMC1 n'est exprimée qu'en méiose (Masson and West, 2001). Les paralogues de Rad51, les protéines Rad55 et Rad57 chez *Saccharomyces cerevisiae*, ou les protéines RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3 chez les mammifères, ne possèdent pas d'activité recombinase malgré leur similarité protéique avec Rad51 (Johnson and Symington, 1995; Sung, 1997).

Orthologue de la protéine RecA, la recombinase RAD51 est un facteur clé de la recombinaison homologue somatique chez les eucaryotes, elle est donc au centre des mécanismes de ciblage génique. Les protéines RAD51 et RecA, sont des protéines très conservées des bactéries à l'homme. Chez *Physcomitrella patens*, il existe deux gènes *RAD51* (*PpRAD51-1* et *PpRAD51-2*) dont les protéines partagent 96% d'identité (Ayora et al., 2002). Les protéines RAD51 de mousse partagent une identité de 50% avec la protéine Rad51 de *Saccharomyces cerevisiae* et de 76% avec la protéine RAD51 d'*Arabidopsis thaliana*.

IV. 1. Structure et domaines

Les protéines RAD51 possèdent des domaines fonctionnels conservés caractéristiques de l'activité recombinase. Afin de catalyser l'appariement homologue et l'invasion de brin, les protéines RAD51 possèdent une activité ATPase dépendante de l'ADN, une affinité pour l'ADN simple brin et la capacité à se polymériser dans le sens 5'-3' le long du brin. Ainsi, des domaines de fixation à l'ADN et à l'ATP sont présents dans ces protéines, ce sont les domaines Walker A et Walker B (en vert). Les protéines RAD51 possèdent également des interfaces de multimérisation (en gris) et plusieurs sites de phosphorylation (étoiles rouges et noires) qui ont été identifiés sur la protéine Rad51 humaine et dont la plupart sont conservés chez *Physcomitrella patens* et *Arabidopsis thaliana*. La thréonine T13 et la sérine S14 sont phosphorylées en réponse aux dommages de l'ADN et facilite le recrutement de Rad51 à la cassure (Yata et al., 2012), la phosphorylation de la tyrosine Y54 est impliquée dans la régulation de la fixation sur l'ADN simple brin (Popova et al., 2009). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la phosphorylation de la sérine S192 (S137 chez la mousse) par Mec1 est nécessaire pour les activités ATPase et de liaison à l'ADN (Flott et al., 2011) et trois résidus conservés (R188, K361 et K371, en rouge) ont été identifiés comme essentiels pour l'invasion de brin en mitose, mais non requis en méiose (Cloud et al., 2012).

IV. 2. Régulation de RAD51

Les cellules possèdent un ensemble de mécanismes régulateurs qui leur permettent de maintenir l'intégrité de leur génome et de s'assurer que la HR se déroule au bon moment, au bon endroit et de façon correcte. Certains de ces mécanismes concernent directement le nucléofilament

Rad51, comme les phosphorylations précédemment décrites ainsi que l'ubiquitination entraînant sa dégradation par le protéasome (Daboussi et al., 2002). D'autres mécanismes font intervenir des régulateurs positifs, comme les médiateurs de la recombinaison, ou des régulateurs négatifs de recombinaison (Krejci et al., 2012).

La protéine RAD51 est donc régulée par plusieurs autres protéines. Chez *Escherichia coli*, la protéine SSB (Single Strand DNA Binding) se fixe à l'ADN ss pour stabiliser ses extrémités et empêcher la reformation de la double hélice (Shereda et al., 2008). L'orthologue de SSB chez les eucaryotes est la protéine RPA (Replication Protein A). C'est une protéine nucléaire abondante qui se lie à l'ADN ss, et empêche ainsi la fixation de RAD51. Mais elle est également capable de supprimer la structure secondaire de l'ADN double brin (db), favorisant ainsi la HR. RPA peut donc stimuler ou inhiber l'assemblage du nucléofilament (Krejci et al., 2012).

Les protéines Rad52 et Rad54 facilitent l'assemblage du filament présynaptique de recombinaison en déplaçant la protéine RPA sur le brin d'ADN (Sung, 1997; Symington, 2002; Mazin et al., 2010). En s'associant avec Rad51, la protéine Rad52 permet également son recrutement au site de CDB chez la levure. Ce sont des médiateurs de recombinaison. De plus, chez les mammifères et les plantes le suppresseur de tumeur BRCA2 permet le chargement de RAD51 (Pellegrini et al., 2002; Siaud et al., 2004). Chez l'homme, la protéine HsRad52 permet de favoriser l'activité d'autres médiateurs de recombinaison comme BRCA2 ou les complexes des paralogues de RAD51, comme le complexe BCDX2 (pour RAD51B/RAD51C/RAD51D/XRCC2), et le complexe CX3 (pour RAD51C/XRCC3) (Masson et al., 2001a, 2001b; Lazaro-trueba et al., 2006; Liu et al., 2007; Klein, 2008).

Il existe également des régulateurs négatifs comme les hélicases Mph1 et Sgs1, et plus récemment, l'hélicase Srs2, qui a été impliquée dans le démantèlement du filament présynaptique Rad51 chez la levure (Langston and Symington, 2005; Krejci et al., 2012).

De la même façon que pour RAD51, des modifications post-traductionnelles concernent les régulateurs de RAD51. Par exemple, la phosphorylation et la sumoylation de RAD52 et RAD54 permettent de réguler leur interaction avec RAD51 (Krejci et al., 2012).

IV. 3. Mutants *rad51*

Chez certaines espèces, l'inactivation du gène *RAD51* est viable, comme chez *Saccharomyces cerevisiae* (Game and Mortimer, 1974), les champignons filamenteux *Aspergillus nidulans* (Seong et al., 1997) et *Neurospora crassa* (Ninomiya et al., 2004), la drosophile (Staeva-Vieira et al., 2003), le nématode (Rinaldo et al., 2002). C'est le cas également chez les plantes *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2004), le maïs (Pawlowski et al., 2003), et *Physcomitrella patens* (Markmann-Mulisch et al., 2007; Schaefer et al., 2010). Par contre, chez la souris (Tsuzuki et al., 1996) et dans les cellules DT40 de poulet (Sonoda et al., 1998), la délétion *rad51* n'est pas viable.

Les souris KO *rad51* stoppent leur développement embryonnaire précocement, ce qui montre l'importance de la HR lors du développement (Tsuzuki et al., 1996). La délétion *rad51* est létale chez les cellules DT40, mais son inactivation conditionnelle a permis de montrer que

l'absence de RAD51 provoquait l'accumulation des cellules en phase G2/M, l'augmentation des aberrations chromosomiques et du taux de mort cellulaire (Sonoda et al., 1998). Cela montre l'importance de la HR au cours du cycle cellulaire, de la prolifération et du développement ainsi que dans la maintenance des chromosomes et la réparation des CDB.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le mutant *rad51* a été isolé sur des critères d'hypermotivité aux radiations et de réduction de la recombinaison mitotique et méiotique (Game and Mortimer, 1974). La sensibilité de ce mutant à plusieurs agents chimiques (bléomycine, cisplatine et MMS) a été démontrée (Abe et al., 1994). De plus, la recombinaison est affectée et l'accumulation des CDB en méiose diminue fortement la sporulation de ce mutant et la viabilité des spores est très faible.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *Atrad51* ne présente pas de phénotype somatique, mais montre une hypersensibilité aux agents génotoxiques. Par contre, le mutant montre un sévère défaut méiotique, et en conséquence ne produit pas de graines (Li et al., 2004). Cette stérilité s'explique par l'absence de réparation des cassures méiotiques, ce qui se traduit par la fragmentation des chromosomes. De façon comparable, chez le maïs, qui possède deux gènes *RAD51*, le double mutant *rad51* présente un développement végétatif normal mais un défaut méiotique conduisant à une stérilité mâle (Li et al., 2007). Chez ces deux plantes, la protéine RAD51 est essentielle en méiose mais ne l'est pas en mitose.

Chez *Physcomitrella patens*, l'inactivation des 2 gènes *PpRAD51* conduisant à la perte de fonction RAD51, affecte le développement végétatif, augmente la sensibilité aux agents génotoxiques inducteurs de CDB (rayonnements γ et bléomycine) et engendre la stérilité chez le double mutant. De plus, cette perte de fonction RAD51 stimule les mutations spontanées (phénotype « mutator »), abolit le ciblage génique et augmente le taux d'intégrations aléatoires (Markmann-Mulisch et al., 2007; Schaefer et al., 2010). Cela montre le rôle de PpRAD51 dans le développement et dans la réparation de l'ADN, et du point de vue du ciblage génique, le rôle de cette protéine dans le contrôle de la balance entre intégrations ciblées et intégrations aléatoires.

De plus, la fonction des protéines PpRAD51 dans le ciblage génique ne peut pas être complétée par la protéine AtRAD51 d'*Arabidopsis thaliana*, malgré une forte identité protéique, de l'ordre de 76% sur la protéine entière et atteignant 90% dans les domaines fonctionnels. Alors que la protéine PpRAD51-1 complémente le défaut méiotique du mutant *Atrad51* (collaboration avec M-P. Doutriaux). Ces résultats suggèrent que les protéines RAD51 de *Physcomitrella patens* possèdent des caractéristiques spécifiques essentielles au ciblage génique, qui pourraient expliquer la plus grande capacité de la mousse pour le ciblage génique par rapport aux plantes supérieures.

Après l'invasion de l'ADN transformant au locus ciblé du génome receveur générée par la recombinase RAD51 et ses partenaires, une autre étape importante pour le ciblage génique est la résolution des molécules de jonctions ainsi créées qui implique notamment des endonucléases particulières.

V. Le complexe RAD1-RAD10

La résolution des molécules de jonction issues de la voie HR ainsi que les queues 3' sortantes issues de la voie SSA nécessitent l'intervention d'endonucléases spécifiques pour traiter ces intermédiaires (Ciccia et al., 2008). Parmi ces endonucléases, le complexe Rad1-Rad10 montre un intérêt particulier : il est impliqué à la fois dans la voie HR et dans la voie SSA, et il semble être impliqué dans le ciblage génique chez la levure et dans les cellules de mammifères (Prado and Aguilera, 1995; Niedernhofer et al., 2001).

Le complexe Rad1-Rad10 est un hétéro-dimère composé de deux sous unités, Rad1 (ou XPF chez les mammifères) et Rad10 (ou ERCC1). Ce complexe est une endonucléase qui reconnaît spécifiquement des structures particulières de l'ADN.

Il existe plusieurs nucléases de ce type : Rad1-Rad10 (ou XPF-ERCC1), Mus81-Mms4 (ou MUS81-EME1), Slx1-Slx4 (ou SLX1 –SLX4) et Yen1 (ou GEN1). Ces nucléases reconnaissent de façon sélective plusieurs types d'intermédiaires de jonction. Ces structures peuvent résulter de la formation et de la migration de la boucle dans la voie HR, comme les jonctions de Holliday (cadres rouges), ainsi que de l'appariement de séquences répétées dans la voie SSA produisant des queues 3' sortantes (cadre vert). Ces nucléases reconnaissent également les fourches de réplication (cadres bleus) ou encore les modifications de nucléotides (cadre noir) avant la réparation par la voie NER (Ciccia et al., 2008; Ip et al., 2008; Schwartz and Heyer, 2011).

V. 1. Structure des protéines

Les protéines RAD1 et RAD10 sont très conservées de la levure à l'homme. La protéine RAD1 est la sous-unité catalytique du complexe, elle possède un domaine nucléase ERCC4 (pour Excision Repair Cross Complementation group 4) fonctionnel et un domaine DEAH (hélicase) inactif. La protéine RAD10 est la sous-unité non catalytique, elle ne possède qu'un domaine ERCC4 inactif (Ciccia et al., 2008; Schwartz and Heyer, 2011). Le domaine ERCC4 de RAD1 confère l'activité de clivage spécifique des structures branchées après association avec RAD10 (Gaillard and Wood, 2001). L'hétérodimérisation est requise pour la stabilisation des deux protéines et pour l'activité nucléase chez la levure comme chez les mammifères (Schiestl, 1988; Schiestl and Prakash, 1990; Sijbers et al., 1996).

V. 2. Rôle dans la réparation de cassure simple brin (CSB)

Le rôle du complexe Rad1–Rad10 a tout d'abord été établi dans la voie de réparation des CSB, c'est une des deux endonucléases essentielles pour l'étape de double incision de la réparation par la voie NER. Chez la levure, le complexe Rad1-Rad10 permet l'incision de l'ADN en 5' de la lésion et l'autre endonucléase Rad2 permet l'excision en 3' de la lésion (Guzder et al., 1995, 1996). Ce mécanisme permet de retirer du génome plusieurs types de lésions CSB induites par les rayonnements U.V et certains agents chimiques (Gaillard and Wood, 2001). Chez l'homme, des défauts de la voie NER causent la maladie Xeroderma pigmentosum (XP), caractérisée par une forte photosensibilité ainsi qu'une très forte augmentation de la prédisposition aux cancers de la peau

et des yeux (Gregg et al., 2011). L'étude de souris KO pour le gène *ERCC1* (*ERCC1*^{-/-}), homologue de RAD10, a permis de montrer l'implication de ce complexe dans d'autres voies de réparation de l'ADN. En effet, ces souris KO ont un retard de croissance, une mort précoce et des anomalies du foie et des reins ne pouvant pas être attribués à la voie NER seule (McWhir et al., 1993; Weeda et al., 1997).

V. 3. Rôle dans la réparation de cassure double brin (CDB) : les voies SSA et HR

Chez la levure, le complexe Rad1-Rad10 est également impliqué dans la recombinaison mitotique (Schiestl, 1988; Schiestl and Prakash, 1990), dans la réparation de CDB (Fishman-Lobell et al., 1992; Ivanov et al., 1996) et plus particulièrement dans le ciblage génique (Prado and Aguilera, 1995). Dans les cellules de mammifères, le complexe XPF-ERCC1 est indispensable pour le ciblage génique (Niedernhofer et al., 2001). Ce complexe pourrait donc être impliqué dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison lors du ciblage génique. Il est à noter que chez la drosophile la protéine Mei9, orthologue de Rad1, est impliquée dans les crossing-over méiotiques (Sekelsky et al., 1995).

L'endonucléase Rad1-Rad10 est nécessaire pour éliminer les séquences non-homologues libres générées lors de la réparation par la voie SSA. Le complexe Rad1-Rad10 permet l'excision de ces queues 3' après appariement des séquences répétées (Lyndaker and Alani, 2009). Les protéines Msh2 et Msh3 de la voie de réparation des mésappariements (MMR) semblent impliquées dans la stabilisation des régions hybridées (Fishman-Lobell et al., 1992).

De plus, les protéines RAD1 et RAD10 sont impliqués dans l'intégration d'une cassette de ciblage chez la levure et dans les cellules ES de souris. En effet, les mutants de levure *rad1* et *msh2* sont très affectés pour le ciblage génique, montrant que les complexes Rad1-Rad10 et Msh2-Msh3 favorisent le ciblage génique en stimulant l'invasion par les deux extrémités et donc la voie HR (Langston and Symington, 2005). Chez la levure, le complexe Rad1-Rad10 serait particulièrement impliqué dans la gestion de l'hétérologie, qui est présente dans le ciblage génique lorsqu'on introduit un marqueur de sélection. Dans les cellules ES de souris, le complexe XPF-ERCC1 est indispensable pour le ciblage génique (Niedernhofer et al., 2001).

Lors du ciblage génique, plusieurs mécanismes de résolution sont possibles pour l'intégration de la cassette de ciblage chez *Saccharomyces cerevisiae* (Langston and Symington, 2005). Dans le premier modèle, s'il y a invasion des deux extrémités de la cassette, l'intégration homologue de celle-ci se fait par la voie HR. Dans le second modèle, l'intégration homologue d'une seule extrémité impliquerait un mécanisme similaire à la voie SSA.

Dans le premier modèle, l'invasion des deux extrémités de la cassette conduit à la formation de deux boucles, chacune constituée d'un hétéroduplex d'ADN. Après expansion des boucles par migration de l'embranchement et réplication jusqu'à la jonction homologie/hétérologie, le clivage au niveau de ces jonctions est nécessaire pour permettre le ciblage (Niedernhofer et al., 2001). Chaque brin du locus génomique doit être clivé au niveau de cette jonction ADN db/ADN sb qui représente un substrat pour l'endonucléase Rad1-Rad10. Cette incision rend possible l'isomérisation de la molécule et finalement le remplacement de gène. Si le brin non envahissant

s'apparie dans la boucle, il y a formation d'une double jonction de Holliday qui est une structure reconnue et prise en charge par des résolvases (flèches blanches). La coupure par Rad1-Rad10 peut alors accompagner les coupures des résolvases (Mus81-Mms4, Yen1 ou Slx1-Slx4) pour éliminer les structures sortantes générées après résolution, afin de permettre la religation.

Dans le second modèle, l'intégration homologue d'une seule extrémité de la cassette de ciblage dans le chromosome crée deux fragments avec des séquences répétées directes de l'autre côté du marqueur de sélection. Après résection des extrémités homologues 5', la réparation peut se faire par un mécanisme similaire au SSA sur une des régions d'homologies (représentées par « D » et « F ») interrompues par une zone d'hétérologie (« E » représentant le marqueur de sélection). Cette réparation peut alors former une structure de type queue 3' nécessitant la nucléase Rad1-Rad10 pour sa résolution, conduisant à l'élimination de la séquence génomique « G » et son remplacement par le marqueur de sélection « E ».

Le complexe Rad1-Rad10 pourrait donc être impliqué dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*, que ce soit dans le cadre de la voie SSA ou de la voie HR.

Pour cette raison et afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le ciblage génique, je me suis également intéressée dans le cadre de mon projet, au rôle que pouvait avoir ce complexe Rad1-Rad10 dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*, qui fait intervenir non seulement la recombinaison homologue mais également une voie apparemment non-homologue de réparation (voir III. 7). En effet, chez *Physcomitrella patens*, il existe deux types d'intégrations ciblées, d'une part les remplacements de gène (ou TGR) qui résultent de deux événements de HR et d'autre part les insertions ciblées (ou TI) qui résultent d'un événement de HR accompagné d'un événement de recombinaison qui apparaît comme non-homologue.

VI. Projet de recherche : Etude des mécanismes de réparation de l'ADN impliqués dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*

Afin d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*, mon projet de recherche s'articule autour de deux questions et repose sur deux approches. Le **chapitre 3** sera consacré aux résultats obtenus dans le cadre de ce projet, il sera constitué de deux parties.

Partie I : Quels sont les domaines protéiques de PpRAD51 impliqués dans le ciblage génique ?

Malgré une forte identité, les protéines RAD51 d'*Arabidopsis thaliana* et de *Physcomitrella patens* ne possèdent pas les mêmes activités. En effet, la protéine AtRAD51 ne permet pas de rétablir le ciblage génique en absence des protéines PpRAD51. Ceci permet de mettre en œuvre une approche comparative entre une espèce végétale très peu compétente pour le ciblage génique,

Arabidopsis thaliana, et une espèce végétale très compétente pour le ciblage génique, *Physcomitrella patens*.

L'approche choisie pour identifier le ou les domaines protéiques essentiels au ciblage est l'analyse fonctionnelle de protéines chimériques entre *Arabidopsis thaliana* et *Physcomitrella patens*.

Partie II : Quel est le rôle de RAD1-RAD10 dans les mécanismes d'intégration lors du ciblage?

Le complexe RAD1-RAD10 semble impliqué dans le ciblage génique chez la levure et dans les cellules animales, et plus précisément dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison. On peut s'interroger sur l'implication de ce complexe chez la mousse *Physcomitrella patens*.

L'analyse de mutants *Pprad1*, *Pprad10* et *Pprad1/Pprad10*, en utilisant différentes cassettes de ciblage, soit avec hétérologie (cassette avec marqueur de sélection) soit sans hétérologie (cassette sans marqueur de sélection), devrait permettre d'apporter des indications concernant l'implication et le rôle de ce complexe dans le ciblage génique chez *Physcomitrella patens*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abe, H., Wada, M., Kohno, K., and Kuwano, M. (1994). Altered drug sensitivities to anticancer agents in radiation-sensitive DNA repair deficient yeast mutants. *Anticancer Research* *14*, 1807–1810.

Al-Minawi, A.Z., Lee, Y.-F., Håkansson, D., Johansson, F., Lundin, C., Saleh-Gohari, N., Schultz, N., Jenssen, D., Bryant, H.E., Meuth, M., et al. (2009). The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links. *Nucleic Acids Research* *37*, 6400–6413.

Amunugama, R., and Fishel, R. (2011). Subunit interface residues F129 and H294 of human RAD51 are essential for recombinase function. *PLoS One* *6*, e23071.

Amunugama, R., He, Y., Willcox, S., Forties, R. a, Shim, K.-S., Bundschuh, R., Luo, Y., Griffith, J., and Fishel, R. (2012). RAD51 protein ATP cap regulates nucleoprotein filament stability. *The Journal of Biological Chemistry* *287*, 8724–8736.

Arnould, S., Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J.-C., Stricher, F., Petit, A.-S., Patin, A., Guillier, S., et al. (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *Journal of Molecular Biology* *355*, 443–458.

Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G.H., and Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS* *24*, 27–31.

Ashton, N.. (1979). Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 427–435.

Ashton, N., and Cove, D.J. (1977). The isolation and preliminary characterization of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* 87–95.

Aslankoochi, E., Voordeckers, K., Sun, H., Sanchez-Rodriguez, A., Van der Zande, E., Marchal, K., and Verstrepen, K.J. (2012). Nucleosomes affect local transformation efficiency. *Nucleic Acids Research* *40*, 9506–9512.

Aylon, Y., and Kupiec, M. (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair* *3*, 797–815.

Ayora, S., Piruat, J.I., Luna, R., Reiss, B., Russo, V.E. a, Aguilera, A., and Alonso, J.C. (2002). Characterization of two highly similar Rad51 homologs of *Physcomitrella patens*. *Journal of Molecular Biology* *316*, 35–49.

Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, a, Steever, a B., Wach, a, Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* *14*, 943–951.

- Bai, Y., and Symington, L.S. (1996). A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* *10*, 2025–2037.
- Bao, Y., and Shen, X. (2007). Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Current Opinion in Genetics & Development* *17*, 126–131.
- Baubonis, W., and Sauer, B. (1993). Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Research* *21*, 2025–2029.
- Baudin, a, Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, a, Lacroute, F., and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* *21*, 3329–3330.
- Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archae with implications for meiotic recombination. *Nature* *386*, 414–417.
- Bird, D., and Bradshaw, R. (1997). Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular & General Genetics* *255*, 219–225.
- Büttner-Mainik, A., Parsons, J., Jérôme, H., Hartmann, A., Lamer, S., Schaaf, A., Schlosser, A., Zipfel, P.F., Reski, R., and Decker, E.L. (2011). Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnology Journal* *9*, 373–383.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell* *47*, 497–510.
- Charbonnel, C., Allain, E., Gallego, M.E., and White, C.I. (2011). Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in *Arabidopsis*. *DNA Repair* *10*, 611–619.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., Tomkinson, A.E., and Antonio, S. (2001). Promotion of Dnl4-Catalyzed DNA End-Joining by the Rad50 / Mre11 / Xrs2 and Hdf1 / Hdf2 Complexes. *Molecular Cell* *8*, 1105–1115.
- Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., Ren, G.-S., Salles, B., and Calsou, P. (2011). Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* *39*, 9605–9619.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* *40*, 179–204.
- Ciccia, A., McDonald, N., and West, S.C. (2008). Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annual Review of Biochemistry* *77*, 259–287.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 is an accessory factor for Dmcl-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science (New York, N.Y.)* *337*, 1222–1225.
- Compton, S. a, Ozgür, S., and Griffith, J.D. (2010). Ring-shaped Rad51 paralog protein complexes bind Holliday junctions and replication forks as visualized by electron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry* *285*, 13349–13356.

- Couëdel, C., Mills, K.D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R.D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G.C., et al. (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes & Development* *18*, 1293–1304.
- Cove, D. (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* *39*, 339–358.
- Daboussi, F., Dumay, A., Delacôte, F., and Lopez, B.S. (2002). DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cellular Signalling* *14*, 969–975.
- Debowski, A.W., Gauntlett, J.C., Li, H., Liao, T., Sehnal, M., Nilsson, H.-O., Marshall, B.J., and Benghezal, M. (2012). Xer-cise in *Helicobacter pylori*: One-step Transformation for the Construction of Markerless Gene Deletions. *Helicobacter* *17*, 435–443.
- Decker, E.L., and Reski, R. (2008). Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* *31*, 3–9.
- Dubest, S., Gallego, M.E., and White, C.I. (2002). Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Reports* *3*, 1049–1054.
- Dubest, S., Gallego, M.E., and White, C.I. (2004). Roles of the AtErc1 protein in recombination. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* *39*, 334–342.
- Dudás, A., and Chovanec, M. (2004). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutation Research* *566*, 131–167.
- Van Duin, M., De Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, M., Hoeijmakers, J., and Bootsma, D. (1986). Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell* *44*, 913–923.
- Essers, J., Van Steeg, H., De Wit, J., Swagemakers, S.M., Vermeij, M., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2000). Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *The EMBO Journal* *19*, 1703–1710.
- Fausser, F., Roth, N., Pacher, M., Ilg, G., Sánchez-Fernández, R., Biesgen, C., and Puchta, H. (2012). In planta gene targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 7535–7540.
- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., and Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Research* *28*, 2585–2596.
- Fidantsef, a L., Mitchell, D.L., and Britt, a B. (2000). The Arabidopsis UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiology* *124*, 579–586.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J.E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Molecular and Cellular Biology* *12*, 1292–1303.

Flott, S., Alabert, C., Toh, G.W., Toth, R., Sugawara, N., Campbell, D.G., Haber, J.E., Pasero, P., and Rouse, J. (2007). Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology* 27, 6433–6445.

Flott, S., Kwon, Y., Pigli, Y.Z., Rice, P. a, Sung, P., and Jackson, S.P. (2011). Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Reports* 12, 833–839.

Freiberg, R.A., Hammond, E.M., Dorie, M.J., Welford, S.M., and Giaccia, A.J. (2006). DNA Damage during Reoxygenation Elicits a Chk2-Dependent Checkpoint Response. *Molecular and Cellular Biology* 26, 1598–1609.

Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, a, Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E., et al. (2001). Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 44413–44418.

Gaillard, P.H., and Wood, R.D. (2001). Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Research* 29, 872–879.

Game, J., and Mortimer, R. (1974). A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation Research* 24, 281–292.

Gouble, A., Smith, J., Bruneau, S., Perez, C., Guyot, V., Cabaniols, J.-P., Leduc, S., Fiette, L., Avé, P., Micheau, B., et al. (2006). Efficient in toto targeted recombination in mouse liver by meganuclease-induced double-strand break. *The Journal of Gene Medicine* 8, 616–622.

Gregg, S.Q., Robinson, A.R., and Niedernhofer, L.J. (2011). Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair* 10, 781–791.

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Molecular Cell* 14, 611–623.

Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1995). Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, Replication Protein A, and Transcription Factor TFIIH. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 12973–12976.

Guzder, S.N., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1996). Nucleotide Excision Repair in Yeast Is Mediated by Sequential Assembly of Repair Factors and Not by a Pre-assembled Repairoosome. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 8903–8910.

Halfter, U., Morris, P., and Willmitzer, L. (1992). Gene targeting in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* 231, 186–193.

Hashimoto, Y., Chaudhuri, A.R., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1305–1311.

Hasty, P., Rivera-perez, J., and Bradley, A. (1991). targeting in embryonic stem cells . The Length of Homology Required for Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. 11,.

Hefner, E., Preuss, S.B., and Britt, a B. (2003). Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *Journal of Experimental Botany* 54, 669–680.

Hinnen, a, Hicks, J.B., and Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 1929–1933.

Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA Damage, Aging and Cancer. *N Engl J Med* 361, 1475–1485.

Ichioka, D., Itoh, T., and Itoh, Y. (2001). An *Aspergillus nidulans* *uvsC* null mutant is deficient in homologous DNA integration. *Molecular & General Genetics* 264, 709–715.

Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357–361.

Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.

Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2245–2251.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic Requirements for the Single-Strand Annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.

Jacquier, A., and Dujon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41, 383–394.

Johnson, R.D., and Symington, L.S. (1995). Functional differences and interactions among the putative RecA homologs Rad51, Rad55, and Rad57. *Molecular and Cellular Biology* 15, 4843–4850.

Kaliraman, V., and Brill, S.J. (2002). Role of SGS1 and SLX4 in maintaining rDNA structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41, 389–400.

Kaliraman, V., Mullen, J.R., Fricke, W.M., Bastin-Shanower, S. a, and Brill, S.J. (2001). Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes & Development* 15, 2730–2740.

Kamisugi, Y., Cuming, A.C., and Cove, D.J. (2005). Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* 33, e173.

Kamisugi, Y., Schlink, K., Rensing, S. a, Schween, G., Von Stackelberg, M., Cuming, A.C., Reski, R., and Cove, D.J. (2006). The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Research* 34, 6205–6214.

- Kass, E.M., and Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters* *584*, 3703–3708.
- Klein, H.L. (1988). Different types of recombination events are controlled by the RAD1 and RAD52 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *120*, 367–377.
- Klein, H.L. (2008). The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* *7*, 686–693.
- Klein, H.L., and Symington, L.S. (2009). Breaking up just got easier to do. *Cell* *138*, 20–22.
- Klein, H.L., and Symington, L.S. (2012). Sgs1--the maestro of recombination. *Cell* *149*, 257–259.
- Kostriken, R., Strathern, J., Klar, A., Hicks, J., and Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *35*, 197–174.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D. a, Eggleston, a K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* *58*, 401–465.
- Krawchuk, M., and Wahls, W. (1999). High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast* *15*, 1419–1427.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research* *40*, 5795–5818.
- Krogh, B.O., and Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annual Review of Genetics* *38*, 233–271.
- De Laat, W.L., Sijbers, a M., Odijk, H., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. (1998). Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF. *Nucleic Acids Research* *26*, 4146–4152.
- Lambert, S., Froget, B., and Carr, A.M. (2007). Arrested replication fork processing: interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair* *6*, 1042–1061.
- Lang, D., Zimmer, A.D., Rensing, S. a, and Reski, R. (2008). Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* *13*, 542–549.
- Langston, L.D., and Symington, L.S. (2004). Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15392–15397.
- Langston, L.D., and Symington, L.S. (2005). Opposing roles for DNA structure-specific proteins Rad1, Msh2, Msh3, and Sgs1 in yeast gene targeting. *The EMBO Journal* *24*, 2214–2223.
- Lazaro-trueba, I., Arias, C., and Silva, A. (2006). Double bolt regulation of Rad51 by p53. *Cell Cycle* *5*, 1062–1065.

Lee, S., Moore, J., Holmes, A., Umezu, K., Kolodner, R., and Haber, J. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94, 399–409.

Li, J., Harper, L.C., Golubovskaya, I., Wang, C.R., Weber, D., Meeley, R.B., McElver, J., Bowen, B., Cande, W.Z., and Schnable, P.S. (2007). Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and double-strand break repair. *Genetics* 176, 1469–1482.

Li, J., and Read, L.R. (2001). The Mechanism of Mammalian Gene Replacement Is Consistent with the Formation of Long Regions of Heteroduplex DNA Associated with Two Crossing-Over Events. *Molecular and Cellular Biology* 21, 501–510.

Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H., and Reiss, B. (2004). The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10596–10601.

Liu, X., Yan, Z., Luo, M., Zak, R., Li, Z., Driskell, R.R., Huang, Y., Tran, N., John, F., and Engelhardt, J.F. (2004). Targeted Correction of Single-Base-Pair Mutations with Adeno-Associated Virus Vectors under Nonselective Conditions. *Journal of Virology* 78, 4165–4175.

Liu, Y., Tarsounas, M., O'regan, P., and West, S.C. (2007). Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 1973–1979.

Liu, Z., Hossain, G.S., Islas-Osuna, M. a, Mitchell, D.L., and Mount, D.W. (2000). Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 21, 519–528.

Lloyd, A., Plaisier, C.L., Carroll, D., and Drews, G.N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2232–2237.

Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287–294.

Lyndaker, A.M., and Alani, E. (2009). A tale of tails: insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 31, 315–321.

Ma, J., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Molecular and Cellular Biology* 23, 8820–8828.

Manivasakam, P., Weber, S.C., McElver, J., and Schiestl, R.H. (1995). Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 23, 2799–2800.

Markmann-Mulisch, U., Hadi, M.Z., Koepchen, K., Alonso, J.C., Russo, V.E.A., Schell, J., and Reiss, B. (2002). The organization of *Physcomitrella patens* RAD51 genes is unique among eukaryotic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2959–2964.

Markmann-Mulisch, U., Wendeler, E., Zobell, O., Schween, G., Steinbiss, H.-H., and Reiss, B. (2007). Differential requirements for RAD51 in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* development and DNA damage repair. *The Plant Cell* *19*, 3080–3089.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* : *78*, 7634–7638.

Masson, J.Y., Stasiak, a Z., Stasiak, a, Benson, F.E., and West, S.C. (2001a). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8440–8446.

Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, a Z., Stasiak, a, Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E., and West, S.C. (2001b). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes & Development* *15*, 3296–3307.

Masson, J.Y., and West, S.C. (2001). The Rad51 and Dmcl1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends in Biochemical Sciences* *26*, 131–136.

Mazin, A., Mazina, O., Bugreev, D., and Rossi, M. (2010). Rad54, the motor of Homologous Recombination. *DNA Repair* *9*, 286–302.

Mazón, G., Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell* *142*, 646, 646.e1.

McElroy, D., Rothenberg, M., Reece, K., and Wu, R. (1990). Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Molecular Biology* *15*, 257–268.

McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D., Squires, S., and Melton, D. (1993). Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nature Genetics* *5*, 217–224.

Meyer, M., De Angelis, M.H., Wurst, W., and Kühn, R. (2010). Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 15022–15026.

Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences* *34*, 264–272.

Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2011). DNA end resection-Unraveling the tail. *DNA Repair* *10*, 344–348.

Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research* *711*, 61–72.

Morrison, C., Shinohara, A., Sonoda, E., Takata, M., and Weichselbaum, R.R. (1999). The Essential Functions of Human Rad51 Are Independent of ATP Hydrolysis. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 6891–6897.

Motycka, T. a, Bessho, T., Post, S.M., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *The Journal of Biological Chemistry* *279*, 13634–13639.

- Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *11*, 196–207.
- Muñoz-Galván, S., Tous, C., Blanco, M.G., Schwartz, E.K., Ehmsen, K.T., West, S.C., Heyer, W.-D., and Aguilera, A. (2012). Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1-Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange. *Molecular and Cellular Biology* *32*, 1592–1603.
- Muris, D., Vreeken, K., Schmidt, H., Ostermann, K., Clever, B., Lohman, P., and Pastink, A. (1997). Homologous recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: different requirements for the *rhp51+*, *rhp54+* and *rad22+* genes. *Current Genetics* *31*, 248–254.
- De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., and Lichten, M. (2012). BLM helicase ortholog Sgs1 is a central regulator of meiotic recombination intermediate metabolism. *Mol Cells* *46*, 43–53.
- Niedernhofer, L.J., Essers, J., Weeda, G., Beverloo, B., De Wit, J., Muijtjens, M., Odijk, H., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2001). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required for targeted gene replacement in embryonic stem cells. *The EMBO Journal* *20*, 6540–6549.
- Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., Drunen, E. Van, Maas, A., Theil, A.F., Wit, J. De, Jaspers, G.J., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2004). The Structure-Specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. *Mol Gen Genet* *24*, 5776–5787.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 12248–12253.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *78*, 6354–6358.
- Pâques, F., and Duchateau, P. (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Current Gene Therapy* *7*, 49–66.
- Pardo, B., Gómez-González, B., and Aguilera, a (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* *66*, 1039–1056.
- Paszkowski, J., Baur, M., Bogucki, a, and Potrykus, I. (1988). Gene targeting in plants. *The EMBO Journal* *7*, 4021–4026.
- Pawlowski, W.P., Golubovskaya, I.N., and Cande, W.Z. (2003). Altered Nuclear Distribution of Recombination Protein RAD51 in Maize Mutants Suggests the Involvement of RAD51 in Meiotic Homology Recognition. *The Plant Cell* *15*, 1807–1816.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* *420*, 287–293.

Popova, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Lebecqec, M., Takahashi, M., and Fleury, F. (2009). Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Letters* 583, 1867–1872.

Porteus, M.H., Connelly, J.P., and Pruett, S.M. (2006). A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genetics* 2, e133.

Prado, F., and Aguilera, A. (1995). Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and Single-Strand Annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10 and RAD52 gens. *Genetics* 139, 109–123.

Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5055–5060.

Rass, E., Grabarz, a, Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiothérapie: Journal De La Société Française De Radiothérapie Oncologique* 16, 1–10.

Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 819–824.

Rensing, S. a, Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E. a, Kamisugi, Y., et al. (2008). The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science (New York, N.Y.)* 319, 64–69.

Reski, R. (1998). *Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses*. *Botanica Acta* 111, 1–15.

Reski, R., and Cove, D.J. (2004). *Physcomitrella patens*. *Current Biology* 14, 261–262.

Rinaldo, C., Bazzicalupo, P., Ederle, S., Hilliard, M., and Volpe, A. La (2002). Radiation During Development. 479, 471–479.

Roberts, J.W., Roberts, C.W., and Craig, N.L. (1978). *Biochemistry* : 75, 4714–4718.

Rödel, C., Kirchhoff, S., and Schmidt, H. (1992). The protein sequence and some intron positions are conserved between the switching gene swi10 of *Schizosaccharomyces pombe* and the human excision repair gene ERCC1. *Nucleic Acids Research* 20, 6347–6353.

Rong, Y.S., and Golic, K.G. (2000). Gene Targeting by Homologous Recombination in *Drosophila*. *Science* 288, 2013–2018.

Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G.M., and Golic, K.G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes & Development* 16, 1568–1581.

Rukšć, A., Birmingham, E., and Baker, M. (2007). Altered DNA repair and recombination responses in mouse cells expressing wildtype or mutant forms of RAD51. *DNA Repair* 6, 1876–1889.

San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry* 77, 229–257.

Sanger, F., Air, G., Barrell, B., Brown, N., Coulson, A., Fiddes, C., Hutchison, C., Slocombe, P., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687–695.

Sargent, R.G., Meservy, J.L., Perkins, B.D., Kilburn, a E., Intody, Z., Adair, G.M., Nairn, R.S., and Wilson, J.H. (2000). Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 28, 3771–3778.

Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods (San Diego, Calif.)* 14, 381–392.

Schaefer, D.G. (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 143–150.

Schaefer, D.G. (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Plant Biology* 53, 477–501.

Schaefer, D.G., Delacote, F., Charlot, F., Vrielynck, N., Guyon-Debast, a, Le Guin, S., Neuhaus, J.M., Doutriaux, M.P., and Nogu e, F. (2010). RAD51 loss of function abolishes gene targeting and de-represses illegitimate integration in the moss *Physcomitrella patens*. *DNA Repair* 9, 526–533.

Schaefer, D.G and Z yrd, J. (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 11, 115–1206.

Schiestl, R.H. (1988). RAD1, an Excision Repair Gene of *Saccharomyces cerevisiae*, Is Also Involved in Recombination. *Molecular and Cellular Biology* 8, 3619–3626.

Schiestl, R.H., and Prakash, S. (1990). RAD10 , an Excision Repair Gene of *Saccharomyces cerevisiae* , Is Involved in the RAD1 Pathway of Mitotic Recombination. *Molecular and Cellular Biology* 10, 2485–2491.

Schiestl, R.H., Zhu, J.I.E., and Petes, T.D. (1994). Effect of Mutations in Genes Affecting Homologous Recombination on Restriction Enzyme-Mediated and Illegitimate Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4493–4500.

Schwartz, E.K., and Heyer, W.-D. (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 120, 109–127.

Sekelsky, J.J., Mckim, K.S., Chin, G.M., and Hawley, R.S. (1995). The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1. *Genetics* 141, 619–627.

Selfridge, J., Pow, A., McWhir, J., Magin, T., and Melton, D. (1992). Gene targeting using a mouse HPRT minigene/HPRT-deficient embryonic stem cell system: inactivation of the mouse ERCC-1 gene. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 18, 325–336.

Seong, K., Chae, S., and Kang, H. (1997). Cloning of an *E. coli* RecA and yeast RAD51 homolog, radA, an allele of the *uvrC* in *Aspergillus nidulans* and its mutator effects. *Mol Cells* 7, 284–289.

Sharma, D., Say, A.F., Ledford, L.L., Hughes, A.J., Sehorn, H. a, Dwyer, D.S., and Sehorn, M.G. (2013). Role of the conserved lysine within the Walker A motif of human DMC1. *DNA Repair* 12, 53–62.

Shereda, R.D., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., Cox, M.M., and Keck, J.L. (2008). SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology* 43, 289–318.

Shinohara, a, and Ogawa, T. (1999). Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes. *Mutation Research* 435, 13–21.

Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Gérard, E., Takvorian, N., and Doutriaux, M.-P. (2004). Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmcl1. *The EMBO Journal* 23, 1392–1401.

Sijbers, a M., Van der Spek, P.J., Odijk, H., Van den Berg, J., Van Duin, M., Westerveld, A., Jaspers, N.G., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1996). Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene ERCC1. *Nucleic Acids Research* 24, 3370–3380.

Simsek, D., Brunet, E., Wong, S.Y.-W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E.J., et al. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genetics* 7, e1002080.

Smith, J., De Sousa, M., Kwabi-Addo, B., Hepell-Parton, A., Impey, H., and Rabbits, P. (1995). A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nature Genetics*.

Smithies, O., Gregg, R., Boggs, S., Koralewski, M., and Kucherlapati, R. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230–234.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, a, Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *The EMBO Journal* 17, 598–608.

Staeva-Vieira, E., Yoo, S., and Lehmann, R. (2003). An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. *The EMBO Journal* 22, 5863–5874.

Stankiewicz, P., and Lupski, J.R. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics : TIG* 18, 74–82.

Stark, J.M., Hu, P., Pierce, A.J., Moynahan, M.E., Ellis, N., and Jasin, M. (2002). ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 20185–20194.

Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L. a, Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., et al. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462, 1005–1010.

Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E. (2000). DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5300–5309.

Sun, N., Abil, Z., and Zhao, H. (2012). Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems. *Biotechnology Journal* 7, 1074–1087.

Sung, P. (1997). Function of Yeast Rad52 Protein as a Mediator between. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 28194–28197.

Sung, P., and Stratton, S.A. (1996). Mediates Polar DNA Strand Exchange in the Absence of ATP Hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 27983–27986.

Svendsen, J.M., and Harper, J.W. (2010). GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes & Development* 24, 521–536.

Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., Connell, B.C.O., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* 138, 63–77.

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 630–670.

Symington, L.S., and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* 45, 247–271.

Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, a, and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 17, 5497–5508.

Terada, R., Urawa, H., Inagaki, Y., Tsugane, K., and Iida, S. (2002). Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnology* 20, 1030–1034.

Tourrière, H., and Pasero, P. (2007). Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair* 6, 900–913.

Trouiller, B., Schaefer, D.G., Charlot, F., and Nogué, F. (2006). MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* 34, 232–242.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, a, Yoshimura, Y., and MoritaT (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6236–6240.

Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* *435*, 646–651.

Vidali, L., and Bezanilla, M. (2012). *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* *15*, 625–631.

Waterworth, W., Drury, G., Bray, C., and West, C. (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytologist* *192*, 802–822.

Waterworth, W.M., Kozak, J., Provost, C.M., Bray, C.M., Angelis, K.J., and West, C.E. (2009). DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC Plant Biology* *9*, 79.

Weeda, G., Donker, I., De Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, a, Van Steeg, H., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Current Biology : CB* *7*, 427–439.

Westerveld, A., Hoeijmakers, J., Van Duin, M., De Wit, J., Odijk, H., Pastink, A., Wood, R., and Bootsma, D. (1984). Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* *310*, 425–429.

Winding, P., and Berchtold, M.W. (2001). The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *Journal of Immunological Methods* *249*, 1–16.

Wirt, S., and Porteus, M. (2012). Development of nuclease-mediated site-specific genome modification. *Current Opinion in Immunology* *24*, 609–615.

Wood, J.G., Hillenmeyer, S., Lawrence, C., Chang, C., Hosier, S., Lightfoot, W., Mukherjee, E., Jiang, N., Schorl, C., Brodsky, A.S., et al. (2011). Chromatin remodeling in the aging genome of *Drosophila*. *9*, 971–978.

Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.-Y., Skehel, M., Smerdon, S.J., and Esashi, F. (2012). Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Molecular Cell* *45*, 371–383.

Zhang, F., Maeder, M.L., Unger-wallace, E., Hoshaw, J.P., Reyon, D., and Christian, M. (2010). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 12028–12033.

Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J. a, Qi, Y., Starker, C.G., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2012). TALENs enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiology* *161*, 20–27.

Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczyński, C.L., and Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 8768–8773.