HAL
open science

Régulation de l'expression du facteur de transcription TFIIIA et des gènes d'ARN ribosomiques 5S chez Arabidopsis thaliana

Elodie Layat

To cite this version:

Elodie Layat. Régulation de l'expression du facteur de transcription TFIIIA et des gènes d'ARN ribosomiques 5S chez Arabidopsis thaliana. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22204 . tel-00719594

HAL Id: tel-00719594

https://theses.hal.science/tel-00719594v1

Submitted on 20 Jul 2012

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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL **UNIVERSITÉ D'AUVERGNE**
N° d'ordre : D.U. 2204 **Année 2011**

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 567

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

Soutenue le 16 Décembre 2011

ELODIE LAYAT

REGULATION DE L'EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION TFIIIA ET DES GÈNES D'ARN RIBOSOMIQUES 5S CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Président :	Pr. Christophe TATOUT, GReD, Aubière
Rapporteurs :	Dr. Marie-Édith CHABOUTÉ, UPR CNRS 2357, Strasbourg
	Dr. Olivier LEFEBVRE, CEA, Gif-sur-Yvette
	Dr. Julio SÁEZ-VÁSQUEZ, UMR CNRS 5096, Perpignan
Examinateur :	Dr. Pierre SOURDILLE, UMR GDEC INRA, Clermont-Ferrand
Directrice de thèse :	Dr. Sylvette TOURMENTE, GReD, Aubière

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

24, avenue des Landais 63177 Aubière

Il est venu le temps des remerciements, il est donc venu le temps de la Fin ! La fin de 4 années bruyantes passées dans les couloirs du labo (et à d'autres étages aussi!). 4 années de stress, d'angoisse, de panique, de doutes et de pleurs mais aussi et heureusement, 4 années de joies, de fous rires, de chouettes moments et de rencontres. On ne comprend qu'à la toute fin d'une thèse, le jour de la soutenance, pourquoi les grands du labo vous disent que la thèse c'est bien et que c'est l'un de leurs meilleurs souvenirs, et on se rend compte à ce moment là à quel point le labo va nous manquer…

Si j'en suis arrivée là, si je suis, aujourd'hui, une toute jeune docteur, c'est grâce à un grand nombre de personnes, alors MERCI :

aux membres du jury : Marie-Edith Chabouté, Olivier Lefebvre, Julio Sáez-Vásquez et Pierre Sourdille qui ont accepté de juger ce travail et à Christophe Tatout d'avoir présidé cette soutenance peu commune qui aura clôturée cette thèse d'une façon exceptionnelle.
à Joachim, pour les rebondissements de dernières minutes qui ont permis la retransmission de cette soutenance… c'est un peu la classe quand même!
à Jean-Louis Renaud qui nous a apporté une aide précieuse pour la mise en place de la soutenance dans les meilleures conditions possibles.

à Sylvette, ma Chef, pour ton enthousiasme et ton optimisme sans failles qui m'ont permis de continuer cette thèse et d'y croire malgré les obstacles, il fallait que l'une de nous deux tienne le coup dans les moments difficiles, c'était toi ! Merci également pour ta confiance, pour ton investissement pendant ces 4 années et pendant la rédaction, pour ta présence et pour les discussions scientifiques ou chiffons. Travaille ton impatience (il sera toujours impossible d'avoir un résultat de western 5 min après être arrivé au labo !), et ce sera parfait ! J'espère que tu es satisfaite de ta petite dernière !?

à Sylvie, ma chef ARN, ma prof bling-bling de génét devenue collègue ++, pour ton aide, tes conseils, pour m'avoir proposé ce premier thé, pour le concert des Têtes Raides, mais aussi et surtout pour ton écoute, merci d'avoir supporté mes états d'âmes, mes bêtises, mes histoires ou celles des autres pendant ces 4 années, le temps passé sur la chaise derrière la porte vont me manquer.

à Sylviane, ma chef prot', pour ton aide précieuse et ta gentillesse, pour la relecture et les critiques de mon manuscrit et des topos, merci ! Les anticorps n'ont plus de secret pour moi ou presque…

à Claudine et Marie-Claude, pour votre aide, votre gentillesse, votre présence dans les labos 3 et 4 et pour ces discussions plus ou moins sérieuses qui ont fait passer bien plus vite les longues journées de laboratoire. Et pardon pour toutes ces graines à semer !

à toute mon équipe, aux actuels et aux anciens,
à Georges, pour vos cours qui m'ont donné le goût de la génétique et l'envie de venir travailler à biomove. Il y a toujours un enseignant qui marque nos années d'études, vous êtes le mien ! A Aline, pour ton intelligence mise à contribution un grand nombre de fois, pour ta disponibilité et pour ton aide si précieuse lors de la rédaction de l'article, pour ta gentillesse et ta douceur, à Christophe, pour ton œil expert et pour tes conseils avisés dans les deux dernières années de ma thèse, à Sam, pour ta gentillesse, ton humour, et ta disponibilité, tu es le Mr Gentil du labo et c'est un compliment ! à Manu, pour ton humour… euh pas toujours ! Je me demande si nous serons un jour d'accord ?!, à Jacqueline, pour tous tes bons conseils,

à Matthias, tu as rempli avec brio le rôle de voisin de paillasse, ton arrivée dans l'équipe a largement contribué à la fin joyeuse de ma thèse,
à Mélanie, pour les pauses thé, pour les nombreuses séances de papotages et de critiques cinématographiques ou musicales,
à Julien, pour ce M2 et cette première année de thèse passés à la paillasse de derrière,

à l'ensemble du labo, passé/présent,
pour les bons moments partagés dans la salle café, pour les discussions à l'entrebâillement d'une porte ou dans le couloir, et pour les conseils scientifiques bien sûr !
à Olivier, dit Odi, pour toutes nos discussions, pour ton aide et tes conseils, pour avoir « râlé » avec moi. J'ai adoré partager ton bureau.
A Simon, pour tes réponses à mes questions,

aux thésards, JB et Cyril, devenus docteurs maintenant, à Mélanie et Heïdi qui le deviendront un jour,
aux thésardes de PCE, à Julie, Emilie P, Annabel et Gaëlle, pour tous les fous rires (discrets !) au RU ou ailleurs,

à tous mes Michels,

à ma pouletch Emilie, pour ta présence et ton soutien dans les bons et mauvais moments de ma thèse et de ma vie, pour tes précieux conseils, pour tes manières, pour tous les instants passés au labo et en dehors, pour ton amitié, pour ces 4 belles années et celles à venir,

à ma Sansan, pour ta spontanéité et ta fraicheur qui ne cesseront jamais de me surprendre, pour ton humour, pour ton écoute, c'est bientôt la fin pour toi aussi, sache que je serais là comme tu l'as été pour moi,

à mes deux américains que j'espère retrouver bientôt plus longtemps qu'une visite éclair,
à Punkie, pour ton coté « snob » contagieux, tes conseils scientifiques pertinents et judicieux (oui, oui), pour ton amitié à plusieurs miles de moi,
à Sébichoux, pour ton accueil à mon arrivée, pour ta gentillesse, pour ton aide et pour les discussions/potins longue distance via gmail,

à mes camarades de promo, Ben, Besso, Pascalou, Prisc et les autres parce que vous avez partagé avec moi bien avant et pendant la thèse des apéros, des galettes, des tapas, parce qu'on est parti à Lavoine, en Ardèche, parce qu'on est allé à la coopé en concert ou à l'after, parce que c'était chouette,

à ma Gueudine, Clémentine, ma cousine, mon amie, pour ta présence depuis 18 ans, pour ton écoute, pour nos conversations téléphoniques de 2h, pour tous ces souvenirs partagés avec toi,

à tous les breuzych et amis dispatchés partout en France, qui m'ont permis d'oublier (ou presque) la thèse le temps d'une soirée, d'un week-end, de vacances, de visites, ou de bons restos,

à ma belle-famille, aux grands, aux petits, au futur, je suis quand même bien tombée !

à mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, si importants pour moi,

à mes parents, qui ont supporté ces années de thèse et c'était pas facile, merci pour votre soutien et vos encouragements,

à mon petit frère dont je suis fière et à qui je souhaite plein de réussite dans ses études et dans sa vie,

à Rémy, de m'accompagner dans la vie, de m'avoir poussée à aller jusqu'au bout, d'être ce que tu es.

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par l'ARN polymérase III qui fait intervenir plusieurs facteurs de transcription dont TFIIIA qui reconnaît spécifiquement le promoteur interne de ces gènes et permet ainsi le recrutement de l'ensemble du complexe de transcription. Le gène TFIIIA est composé de sept exons dont le troisième, résultant de l'exonisation d'une molécule d'ARNr 5S, est épissé de façon alternative produisant ainsi deux transcrits. Le transcrit ES, qui ne contient pas cet exon, code pour la protéine TFIIIA pleine longueur et fonctionnelle. Le transcrit EI, dans lequel l'exon « 5S-like » est maintenu, est reconnu et dégradé par la voie NMD (Non-Mediated Decay). L'exon « 5S-like » a, en effet, la particularité de contenir un codon stop prémature qui en fait une cible de la voie NMD. Lors de l'étude de l'expression des transcrits ES et EI ainsi que celle de l'accumulation de la protéine TFIIIA au cours du développement, nous avons montré que le taux de la protéine TFIIIA fonctionnelle est soumis à plusieurs niveaux de régulation. En effet, la production de la protéine TFIIIA pleine longueur est le résultat de la synthèse du transcrit ES et de sa traduction mais également de l'efficacité du clivage protéolytique de la protéine. Lors de la maturation de la graine, l'accumulation croissante de protéine TFIIIA résulte d'une augmentation des quantités de transcrits ES couplée à une diminution du clivage protéolytique. Dans les premiers jours du développement, la protéine TFIIIA n'est détectée qu'après le 4ème jour, suite à la diminution du clivage. Sa présence est corrélée au remodelage de la chromatine de l'ADNr 5S. La combinaison de ces deux mécanismes permet ainsi la production de TFIIIA et de son produit de transcription l'ARNr 5S en fonction des besoins de la plante.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, 5S rRNA genes are transcribed by RNA polymerase III. TFIIIA, specifically required for transcription of these genes, binds to the internal control region of the 5S rRNA genes and allows the assembly of the full transcription complex pol III. The TFIIIA gene consists of seven exons, the third of which results in the exonisation of one 5S rRNA molecule. This exon "5S-like" is alternatively skipped or included to produce either of two transcript isoforms. The ES transcript encodes the fully functional TFIIIA protein. The EI transcript, which contains the exon "5S-like", is a target of the NMD pathway (Non-Mediated Decay). Indeed, the exon "5S-like" contains a premature stop codon, which is recognized by this RNA decay pathway. During the study of the ES and EI transcripts expression and the TFIIIA protein accumulation throughout the plant development, we show that TFIIIA functional protein levels are under control of many regulation steps. Actually the production of the full-length TFIIIA protein results from production and translation of the ES transcript but also from the proteolytic cleavage efficiency of TFIIIA protein. During the seed maturation, the strong accumulation of TFIIIA results from an increase in ES amounts and a proteolytic cleavage decrease. After the fourth day post-germination, TFIIIA protein is detected because the proteolytic cleavage decreases. TFIIIA presence is correlated with 5S rDNA chromatin reorganization. The combination of these two mechanisms allows TFIIIA production and its transcription product 5S rRNA according to the plants needs.

SOMMAIRE

Liste des abréviations 4

Liste des illustrations 6

Synthèse Bibliographique 8

Introduction 9

Chapitre 1 : L'ARN ribosomique 5S 10

I. Le ribosome 11

II. L'ARN ribosomique 5S 12

II.1. Fonctions 12

II.2. Structure 12

II.3. L'ARNr 5S et les complexes ribonucléoprotéiques 13
II.3.1. Les complexes 5S RNP, 7S RNP et 42S RNP : rôles dans l'ovocyte de xénope 13
II.3.2. L'ARNr 5S sous une forme complexée dans les autres organismes 14

III. Les gènes d'ARNr 5S 15

III.1. Organisation des gènes d'ARNr 5S 15

III.2. Localisation des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* 15

III.3. Structure de l'unité génique d'ADNr 5S 16
III.3.1. Le promoteur interne 17
III.3.2. La région 5' 17
III.3.3. La région 3' 18

III.4. Les gènes d'ARNr et la stabilité du génome 19

IV. Expression des gènes d'ARNr 5S 20

IV.1. Mécanisme transcriptionnel de type ARN polymérase III 20
IV.1.1. Le facteur de transcription TFIIIA 21
IV.1.2. Le facteur de transcription TFIIIC 21
IV.1.3. Le facteur de transcription TFIIIB 23

IV.2. Régulation développementale de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus laevis* 23
IV.2.1. Implication des facteurs de transcription dans l'expression différentielle des gènes d'ARNr 5S ovocytaires et somatiques chez le xénope 24
IV.2.2. Les gènes ovocytaires sont réprimés par la structure chromatinienne après l'ovogénèse 25

IV.3. Variabilité d'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* 26
IV.3.1. Tous les loci 5S ne sont pas exprimés 26
IV.3.2. Toutes les unités 5S des loci du chromosome 4 et du grand locus du chromosome 5 ne sont pas exprimées 27

IV.4. Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* 28
IV.4.1. La méthylation des gènes d'ARNr 5S 29
IV.4.2. La chromatine, répresseur des gènes d'ARNr 5S minoritaires 31
IV.4.3. La voie de méthylation RdDM contrôle l'expression des gènes d'ARNr 5S minoritaires. 31

IV.5. La voie TOR participe au contrôle de l'expression des gènes d'ARNr 5S 34

V. Remodelage de la chromatine d'ADNr 5S dans les premiers jours du développement 35

Chapitre 2 : Le facteur de transcription TFIIIA 38

I. Divergences inter-espèces 39

II. TFIIIA chez *Xenopus laevis* **40**

II.1. Le gène TFIIIA de *Xenopus laevis* 40

II.2. La protéine TFIIIA de *Xenopus laevis* 42

III. La protéine TFIIIA chez *Saccharomyces cerevisiae* **44**

IV. TFIIIA chez Arabidopsis thaliana **45**

IV.1. Le gène TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana* 46

IV.2. Régulation de l'expression de TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana* 47

IV.2.1. Le transcrit EI n'est pas traduit 47

IV.2.2. Régulation de l'épissage alternatif 48

Objectifs des travaux de thèse **51**

Résultats **54**

I. Rôle du transcrit EI **55**

I.1. Etablissement de lignées RNAi-EI 56

I.2. Etablissement de lignées étiquetées à partir des ORF 1 et 2 du transcrit EI 57

I.3. Etablissement de lignées de complémentation du mutant TFIIIA 58

I.4. Le transcrit EI n'est pas à l'origine de l'isoforme courte 59

II. Le taux de la protéine TFIIIA dans la cellule est à la fois contrôlé par l'épissage alternatif du gène TFIIIA et par le clivage protéolytique de TFIIIA **60**

Transcription levels, alternative splicing and proteolytic cleavage of TFIIIA control 5S rRNA accumulation during *Arabidopsis thaliana* development **62**

Résultats complémentaires **106**

III. Mise en évidence d'une protéine correspondant à la partie N-terminale de TFIIIA **106**

III.1. Utilisation d'un anticorps anti-TFIIIA N-terminal : Ac18 106

III.2. Etablissement de lignées transgéniques étiquetées permettant de confirmer le clivage 107

IV. La protéine TFIIIA est clivée au cours du développement **108**

IV.1. Clivage de TFIIIA dans les premières heures du développement de la plantule 108

IV.2. Clivage de TFIIIA dans la première paire de feuilles 109

V. Le protéasome 26S n'intervient pas dans le clivage de la protéine TFIIIA à 5 jours post-germination **110**

VI. Epissage alternatif du gène TFIIIA et adaptabilité à l'environnement **111**

Discussion et Perspectives **113**

I. L'épissage alternatif du gène TFIIIA n'est pas indispensable à la vie de la plante **114**

II. Le clivage protéolytique régule les taux de la protéine TFIIIA dans la plante au cours du développement **116**

II.1. Pendant la phase reproductive 116

II.2. De la germination à 2 jours 117

II.3. De 2 à 10 jours post-germination 118
II.4. Dans la première paire de feuilles 121
III. Confirmation du clivage de la protéine TFIIIA 122
III.1. Mise en évidence de la partie N-terminale du clivage : TFIIIA-N 122
III.2. L'identification du site de clivage 122
IV. Facteurs de transcription et clivage protéolytique 123
IV.1. Les acteurs responsables du clivage de TFIIIA 125
IV.2. Rôles potentiels des formes clivées 125
Perspectives 126
Matériel et Méthodes 128
I. Plantes et conditions de cultures 129
I.1. Conditions de culture classique 129
I.2. Conditions de stress 129
I.3. Etablissement de lignées transgéniques 129
I.3.1. Construction des vecteurs d'intérêt 129
I.3.2. Transformation de plantes 130
I.4. La lignée mutante TFIIIA 131
II. Etude de l'expression des transcrits ES et EI et de l'accumulation des ARNr 5S 131
II.1. Extraction d'ARN totaux 131
II.2. Analyse de l'expression des transcrits ES et EI par RT-PCR semi-quantitative 132
II.3. Etude de l'accumulation des ARNr 5S par Northern Blot 132
III. Etude de la protéine TFIIIA 133
III.1. Extraction protéique 133
III.2. Western blot 133
III.3. Les anticorps anti-TFIIIA 134
III.4. Séquençage par LC-MS/MS 135
III.5. Traitement de plantules au MG132 135
Références 136
Annexes 158
Regulation of Pol I-Transcribed 45S rDNA and Pol III-Transcribed 5S rDNA in Arabidopsis ... 159

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN Complémentaire
ADNr : ADN ribosomiques
AGO4: Argonaute 4
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN Messager
ARNr : ARN ribosomiques
ARNsn : ARN small nuclear
ARNt : ARN de transfert
BAC : Bacterial Artificial Chromosome
CaMv : Cauliflower mosaic virus
CIA : Chloroform Isoamyl Alcohol
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
CMT3 : Chromomethylase 3
COC : Chromosome Organizing Clamps
Col : Ecotype Columbia
DCL3 : Dicer-Like protein 3
DDM1 : Decrease in DNA Methylation 1
DRM2 : Domains Rearranged Methyltransferase 2
EI : Exon Inclusion
ES : Exon Skipping
ETC : Extra-TFIIIC
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
HDA6 : Histone Deacétylase 6
ICR : Internal Control Region
MET1 : Methyltransferase 1
MMS : Méthyl Méthane Sulfonate
MS : MS salt medium
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Nuclear Localization Signal
NMD : Non-Mediated Decay
NOR : Nucleolar Organizing Region
ORF : Open Reading Frame
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pol I : ARN polymérase I
Pol II : ARN polymérase II
Pol III : ARN polymérase III
Pol IV : ARN polymérase IV
Pol V : ARN polymérase V
PTC : Premature Translational termination Codon
RdDM : RNA-directed DNA methylation
RDR2 : RNA-dependent RNA polymérase 2
RNAi : ARN interference
RNP : Ribonucléoprotéique

ROS1 : Repressor Of Silencing 1
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR
RUST : Regulated Unproductive Splicing and Translation
siRNA : Small Interfering RNA
SV40 : Simian Virus 40
SWI/SNF : SWITCH (SWI)/Sucrose Non-Fermenting (SNF)
T-DNA : Transfert-DNA
TAF : TBP Associated Factors
TAS : Trans-Activation Site
TBP : TATA-Binding Protein
TFIIIA : Transcription Factor IIIA
TFIIIB : Transcription Factor IIIB
TFIIIC : Transcription Factor IIIC
TOR : Target Of Rapamycin
USF : Upstream Stimulatory Factor
UV : Ultra Violet
YAC : Yeast Artificial Chromosome

Liste des illustrations

Figures

1 : Composition des ribosomes procaryotes et eucaryotes. 10

2 : Structure secondaire de l'ARNr 5S chez l'homme. 11

3 : Les différents complexes de l'ARNr 5S dans l'ovocyte de xénope. 13

4 : Localisation des loci d'ADNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia. 16

5 : Représentation schématique des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*. 17

6 : Signatures des différents loci 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia. 18

7 : Formation du complexe de transcription pol III au niveau d'un gène d'ARNr 5S. 21

8 : Représentation schématique de l'expression des deux familles de gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus laevis,* au cours du développement. 24

9 : Les gènes d'ARNr 5S minoritaires sont réprimés dans une plante sauvage. 29

10 : Des boucles d'ADNr 5S émanent des chromocentres dans un noyau de feuille d'une plante de 3 semaines. 31

11 : Représentation schématique de la voie RdDM. 32

12 : Représentation schématique de la voie de régulation TOR. 34

13 : Organisation de la chromatine d'ADNr 5S dans les premiers jours du développement chez Arabidopsis. 35

14 : Alignement des séquences primaires de TFIIIA de différentes espèces. 39

15 : Représentation schématique du gène TFIIIA et de ses séquences régulatrices chez *Xenopus laevis*. 41

16 : Rôles des doigts de zinc de la protéine TFIIIA chez *Xenopus laevis* et *Saccharomyces cerevisiae*. 42

17 : L'ARN pré-messager *At*TFIIIA contient un exon alternatif. 46

18 : Comparaison de la structure secondaire de l'ARNr 5S et de l'exon alternatif « 5S-like » du gène TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*. 48

19 : Régulation de l'épissage alternatif du pré-messager TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*. 49

20 : Localisation des sites de reconnaissance des anticorps anti-TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*. 55

21 : Les anticorps Ac16 et Ac17 révèlent la protéine TFIIIA et une protéine plus courte. 55

22 : Certaines lignées « RNAi-EI » présentent des quantités variables de TFIIIA et de l'isoforme courte. 56
23 : La lignée RNAi-EI 9 présente un retard de croissance par rapport à une plante sauvage. ... 57
24 : L'anticorps 18 révèle une protéine qui suit le profil d'accumulation de TFIIIA-C. 107
25 : La protéine TFIIIA accumulée dans la graine est dégradée dès la germination. 109
26 : Les cotylédons proviennent d'un lignage cellulaire différent de celui des feuilles..... 109
27 : L'accumulation des protéines TFIIIA et TFIIIA-C présente un profil similaire dans la 1ère paire de feuilles et les cotylédons. 110
28 : La voie du protéasome 26S n'intervient pas dans la dégradation des formes TFIIIA et TFIIIA-C 5 jours après la germination. 111
29 : Les plantes n'exprimant que le transcrit ES sont moins résistantes que des plantes sauvages. 112
30 : Le couple d'amorces TFIIIA17/TFIIIA18 permet d'amplifier les deux transcrits du gène TFIIIA, ES et EI. 132

Tableaux

1 : Les promoteurs reconnus par l'ARN polymérase III 16
2 : Nombre de copies d'ADNr par cellule haploïde 20
3 : Conditions de RT-PCR selon le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) 133
4 : Amorces utilisées 133

Synthèse Bibliographique

Introduction

Dans tous les organismes, la synthèse protéique, processus essentiel, requiert des ribosomes fonctionnels. Les gènes d'ARN ribosomique 5S (ARNr 5S), du fait de leur implication dans la composition de ces ribosomes, sont indispensables à la survie de la plante. Dans une cellule, la biosynthèse du ribosome représente, à elle seule, 80% de l'activité transcriptionnelle totale. L'expression des gènes d'ARNr 5S se doit donc d'être précise et fortement régulée. Chez *Arabidopsis thaliana*, notre modèle d'étude, ces gènes sont localisés dans la région péricentromérique des chromosomes, une région hétérochromatique, considérée comme peu permissive à l'expression des gènes. Une autre caractéristique notable des gènes d'ARNr 5S est leur nombre important de copies, considéré en excès par rapport au besoin en ARNr 5S de la cellule. Il a été démontré que plusieurs mécanismes épigénétiques étaient impliqués dans la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S. Toutefois, ces mécanismes ne sont pas les seuls à contrôler l'expression des gènes d'ARNr 5S. L'acteur majeur de l'expression de ces gènes reste le complexe de transcription ARN polymérase III. Lors de la transcription des gènes 5S, plusieurs facteurs de transcription de la machinerie transcriptionnelle ARN pol III interviennent, notamment TFIIIA qui est spécifique des gènes d'ARNr 5S. TFIIIA est l'initiateur de la transcription des gènes d'ARNr 5S puisque c'est lui qui reconnaît le promoteur interne de ces gènes afin de recruter les autres composants du complexe de transcription ARN pol III. Il est donc considéré comme un des facteurs limitant de l'expression de ces gènes.

L'objectif de mon travail de thèse étant d'étudier l'expression du facteur de transcription TFIIIA et son impact sur l'expression des gènes d'ARNr 5S je décrirai, dans un premier chapitre de la synthèse bibliographique, le modèle d'étude de cette thèse qu'est l'ARNr 5S ainsi que les connaissances actuelles concernant la régulation de son expression. Le deuxième chapitre concerne les similarités des deux familles d'ADNr, 5S et 45S, chez *Arabidopsis thaliana*, qui a fait l'objet d'une revue. Dans un troisième chapitre, je présenterai le facteur de transcription TFIIIA, au travers des connaissances acquises par des études menées notamment chez le xénope et l'état des connaissances chez *Arabidopsis thaliana*.

Chapitre 1 : L'ARN ribosomique 5S

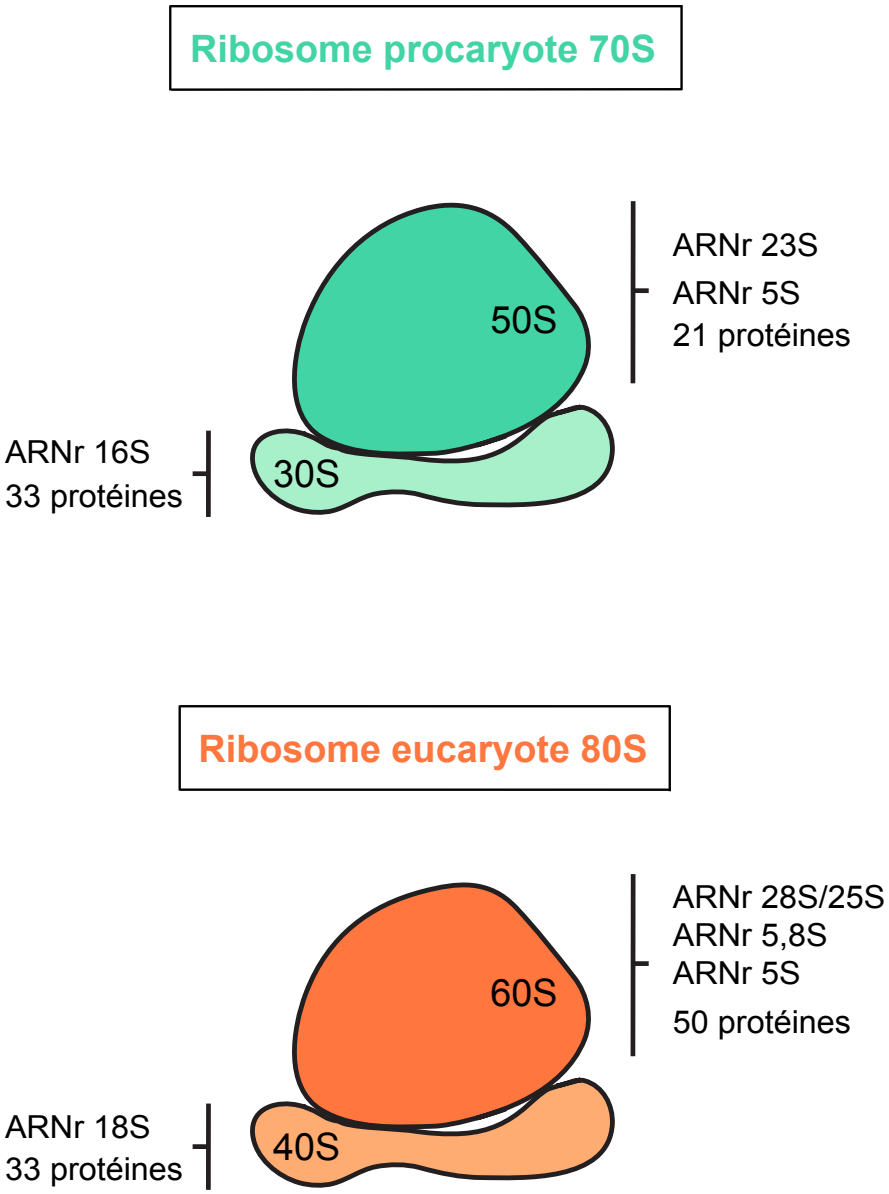


Figure 1 : Composition des ribosomes procaryotes et eucaryotes.
L'ARNr 28S est remplacé par l'ARNr 25S chez les plantes.

I. Le ribosome

Le ribosome, complexe ribonucléoprotéique, joue un rôle majeur dans la cellule puisqu'il est au centre du processus traductionnel. Considéré comme une usine à protéines, il permet la synthèse d'une chaîne polypeptidique à partir de l'ARN messager (ARNm) en coordonnant l'intervention des ARN de transfert (ARNt) porteurs d'acides aminés et différents facteurs de traduction. Du fait de son rôle central lors de la traduction, il est retrouvé dans tous les organismes qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes et hautement conservé au cours de l'évolution. En effet, le ribosome est toujours constitué d'une grande et d'une petite sous-unité. La petite sous-unité est connue pour décoder l'information portée par l'ARNm alors que la grande sous-unité est impliquée dans les activités catalytiques de la traduction. Malgré la conservation de leurs fonctions, la composition de chacune des sous-unités ainsi que leur taille varient cependant selon les règnes. Chez les procaryotes, le ribosome 70S est constitué de trois ARNr et d'environ 54 protéines. L'ARNr 16S est intégré dans la sous-unité 30S, les ARNr 5S et 23S, dans la sous-unité 50S (Figure 1) (WILSON and NIERHAUS 2003). Chez les eucaryotes, le ribosome 80S est composé de quatre ARN ribosomiques (ARNr) distincts, l'ARN ribosomique 18S dans la sous-unité 40S, les ARNr 5S, 5,8S et 28S dans la sous-unité 60S et d'un peu plus de 80 protéines. Chez les plantes, l'ARNr 25S remplace l'ARNr 28S.

Chez les eucaryotes, la synthèse du ribosome a la particularité de nécessiter l'intervention des trois ARN polymérases de la cellule. L'ARN polymérase I intervient lors de la synthèse du précurseur 45S qui après maturation donnera les ARNr 18S, 28S/25S et 5,8S. L'ARNr 5S provient de la transcription par l'ARN polymérase III. Tandis que les protéines ribosomales sont traduites à partir d'ARNm transcrits par l'ARN polymérase II. Une fois produits, les différents constituants du ribosome sont associés en particules pré-ribosomales dans le nucléole qui seront ensuite exportées dans le cytoplasme où elles seront assemblées en ribosome mature lors de l'initiation de la traduction.

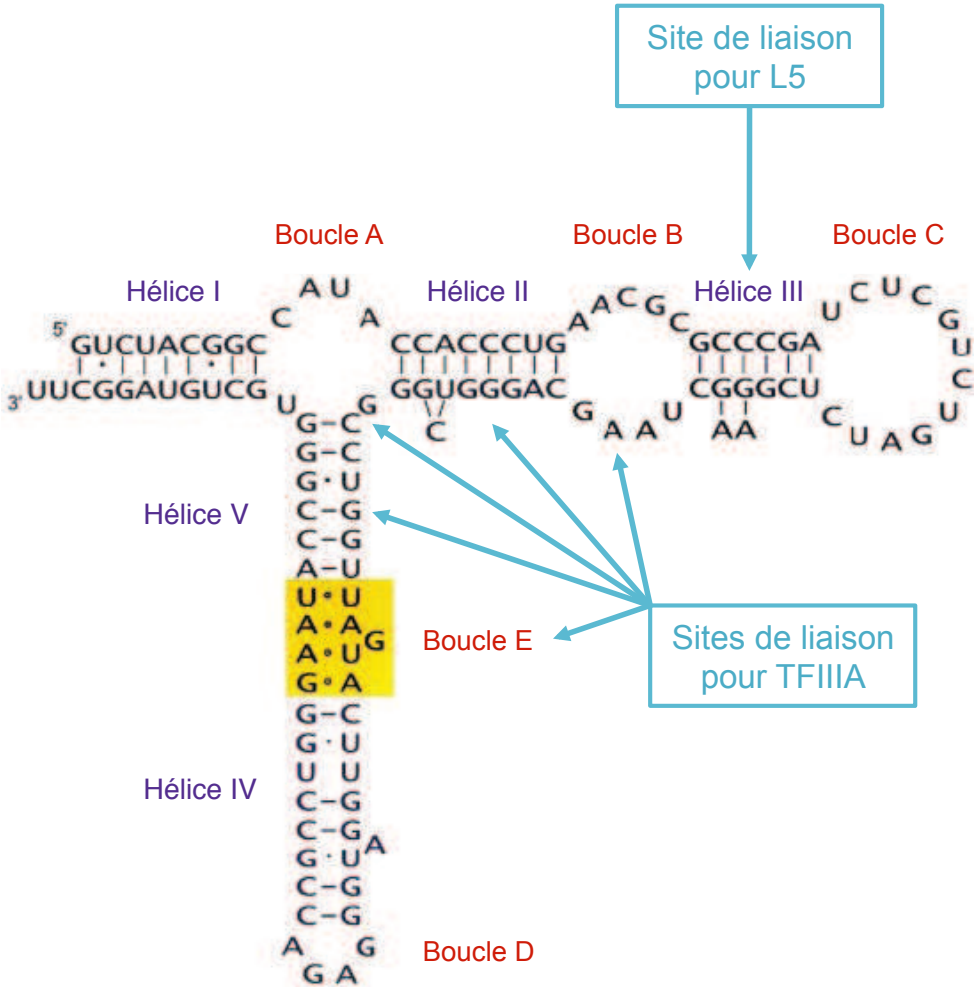


Figure 2 : Structure secondaire de l'ARNr 5S chez l'homme.
Les sites importants pour la liaison des protéines TFIIIA et L5 sont indiqués.
(D'après Szymanski *et al.*, 2002)

II. L'ARN ribosomique 5S

II.1. Fonctions

Les gènes d'ARNr 5S font partie des premiers gènes étudiés en détail d'un point de vue structurel du fait de leur organisation sous forme d'unités répétées en tandem (Cf. III.1.) et de leur importance biologique. Cependant, bien qu'il ait été découvert il y a bientôt 50 ans, le rôle de l'ARNr 5S au sein du ribosome n'a toujours pas été clairement défini. Des études suggèrent qu'il interviendrait dans la transduction du signal entre le domaine porteur de l'activité peptidyltransférase et le domaine de translocation de la grande sous-unité du ribosome (DOKUDOVSKAYA *et al.* 1996; HUBER *et al.* 2001). Il pourrait aussi stabiliser cette dernière (HOLMBERG and NYGARD 2000). L'ARNr 5S pourrait en fait tenir un rôle de coordinateur entre les différents centres réactionnels du ribosome. En effet, il est capable d'établir un grand nombre d'interactions ARN/protéines et ARN/ARN, et les différentes mutations de cette molécule sont à l'origine de phénotypes variés de dysfonctionnement du mécanisme de traduction (SMITH *et al.* 2001). Quoiqu'il en soit, l'importance de l'ARNr 5S au sein du ribosome a été démontrée chez *E. coli* où la délétion d'au moins un des gènes d'ARNr 5S entraîne une forte chute du taux de croissance bactérienne (AMMONS *et al.* 1999).

L'ARNr 5S a été fortement utilisé comme modèle pour l'étude des structures des ARN, du fait de sa petite taille, ou comme marqueur dans des études phylogénétiques du fait de sa conservation dans un grand nombre d'espèces. Il est, de plus, capable d'interagir avec des protéines en dehors du ribosome, ce qui fait de lui un outil intéressant pour les interactions de type ARN/protéines.

II.2. Structure

L'ARNr 5S est une petite molécule de 120 nucléotides qui adopte une structure secondaire hautement conservée, constituée de 5 hélices (I-V) et de 5 boucles (A-E) (Figure 2). L'ensemble de ces hélices et de ces boucles permet des interactions avec les différents partenaires de l'ARNr 5S, notamment le facteur de transcription TFIIIA et la protéine ribosomale L5 (cf. Chapitre ARNr 5S II.3. et Chapitre TFIIIA II.2.). Les hélices II et V et les boucles A, B et E forment le site de liaison principal avec TFIIIA (THEUNISSEN *et al.* 1992).

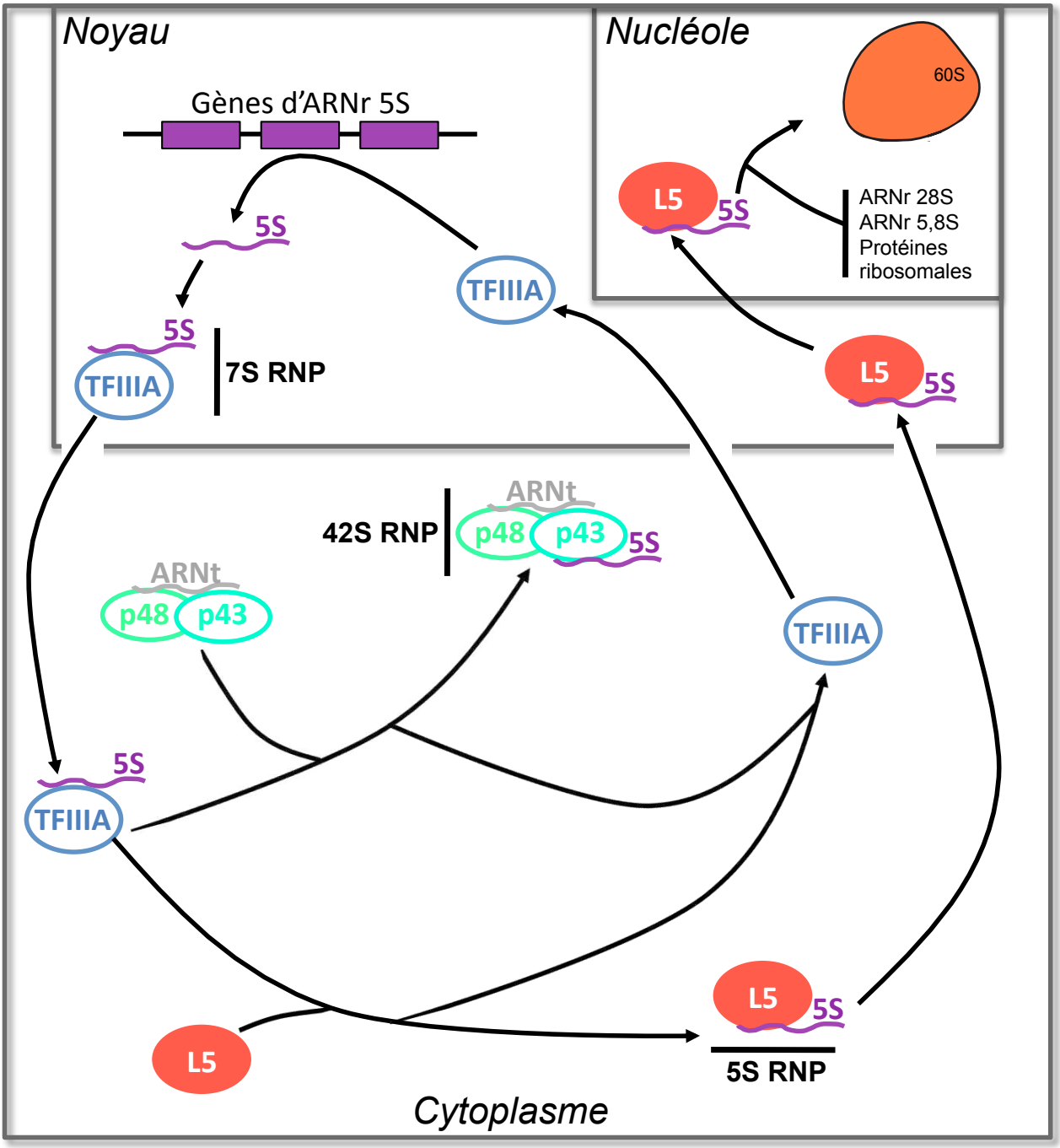


Figure 3 : Les différents complexes de l'ARNr 5S dans l'ovocyte de xénope.
Les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par l'ARN polymérase III. TFIIIA initie cette transcription. Une fois transcrit l'ARNr 5S se lie à TFIIIA et forme le complexe 7S RNP, permettant ainsi son transport et stockage dans le cytoplasme. Il peut également être stocké sous la forme 42S RNP. Lorsque l'ARNr 5S est lié à la protéine L5 (5S RNP), il est transporté dans le nucléole pour être incorporé à la sous-unité ribosomale 60S.
(D'après Szymanski *et al.*, 2003)

Tandis que l'hélice III est le site crucial de liaison à L5 (SCRIPTURE and HUBER 1995) (Figure 2). L'hélice I joue un rôle dans la stabilisation de la molécule d'ARNr 5S et son intégration dans le ribosome (RAUE *et al.* 1981).

II.3. L'ARNr 5S et les complexes ribonucléoprotéiques

II.3.1. Les complexes 5S RNP, 7S RNP et 42S RNP : rôles dans l'ovocyte de xénope

Bien que l'ARNr 5S se lie préférentiellement à l'ARNr 28S (NISSEN *et al.* 2001), et à des protéines ribosomales, il a été démontré qu'il était également capable d'interagir avec des protéines non-ribosomales.

Chez *Xenopus laevis*, il a été démontré dans l'ovocyte qui accumule de grandes quantités d'ARNr 5S, qu'une fois transcrit, l'ARNr 5S se complexe avec son propre facteur de transcription, TFIIIA, formant ainsi le complexe 7S RNP. Ce complexe va permettre le transport de l'ARNr 5S néosynthétisé du noyau vers le cytoplasme et de le stocker en attendant que l'ensemble des composants du ribosome soit disponible. L'ARNr 5S est retrouvé sous une seconde forme dans le cytoplasme, cette fois-ci associé à la protéine ribosomale L5, pour donner le complexe 5S RNP, à la suite d'un échange avec TFIIIA. Dans cette configuration, l'ARNr 5S va pouvoir être transporté jusqu'au nucléole, lieu d'assemblage du ribosome (ALLISON *et al.* 1991; GUDDAT *et al.* 1990). TFIIIA, alors libéré, va retourner dans le noyau et transcrire de nouveau les gènes d'ARNr 5S (Figure 3).

Il a été démontré qu'une surexpression de L5 dans des embryons de xénope induisait l'activation transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S normalement inactifs, mimant l'effet d'une surexpression de TFIIIA (PITTMAN *et al.* 1999). Les interactions entre l'ARNr 5S, TFIIIA et L5 sont donc cruciales pour la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S. Ce système d'échange d'ARNr 5S entre TFIIIA et L5 permettrait de réguler la quantité de TFIIIA libre dans la cellule, et de jouer ainsi sur la transcription des gènes d'ARNr 5S.

La troisième forme sous laquelle l'ARNr 5S est retrouvé chez le xénope est le complexe 42S RNP. Environ 50% des ARNr 5S présents dans des ovocytes immatures sont retrouvés dans les particules 42S. Ce sont des structures relativement complexes (DENIS and LE MAIRE 1983; KLOETZEL *et al.* 1981) qui sont composées de l'ARNr 5S, d'ARNt et de deux protéines, p48 et p43 (PICARD *et al.* 1980). C'est la protéine p43 qui lie directement l'ARNr 5S

au sein de ce complexe. En effet, p43 est une protéine de type zinc-finger qui, comme TFIIIA, possède 9 doigts de zinc. Cependant, elle lie exclusivement les ARNr 5S et ne reconnaît pas les mêmes sites de liaisons que le facteur de transcription des gènes 5S (JOHO *et al.* 1990; ZANG and ROMANIUK 1995). Tout comme le complexe 7S RNP, le complexe 42S RNP permet le stockage des ARNr 5S dans le cytoplasme, et ce, pendant l'ovogénèse (Figure 3).

Une étude a également montré que les ARNr 5S nouvellement synthétisés interagissent de façon transitoire avec l'antigène La avant d'être remplacé par L5 ou TFIIIA (GUDDAT *et al.* 1990). La protéine La est connue pour être impliquée dans la transcription de type ARN pol III. En effet, elle intervient notamment lors de la maturation des transcrits ARN pol III en se fixant à leur extrémité 3' (GOTTLIEB and STEITZ 1989; MARAIA *et al.* 1994).

II.3.2. L'ARNr 5S sous une forme complexée dans les autres organismes

Chez les mammifères, une minorité d'ARNr 5S, environ 1%, est complexée à l'antigène La (RINKE and STEITZ 1982). L'ARNr 5S est également complexé à L5. Ce complexe 5S RNP permettrait le passage de l'ARNr 5S du nucléoplasme au lieu d'assemblage de la sous-unité 60S dans le nucléole (STEITZ *et al.* 1988).

Dans d'autres organismes, l'ARNr 5S est également lié à des protéines ribosomales. Chez la levure, l'ARNr 5S est complexé à la protéine ribosomale L1. La formation de ce complexe ARNr 5S/L1 semble indispensable à la stabilité de l'ARNr 5S néosynthétisé ainsi qu'à la formation de la sous-unité 60S (DESHMUKH *et al.* 1993). Chez les bactéries, l'ARNr 5S a été retrouvé complexé à trois protéines, L5, L18 et L25 (CHEN-SCHMEISSER and GARRETT 1977).

Chez *Arabidopsis thaliana*, bien qu'il ait été démontré que la protéine L5 et la protéine TFIIIA étaient capables de lier directement l'ARNr 5S (MATHIEU *et al.* 2003b), aucune donnée concernant le stockage de l'ARNr 5S dans le cytoplasme n'est connue. Aucune protéine telle que p43 c'est-à-dire contenant 9 doigts de zinc, hormis TFIIIA, n'a été identifiée. Récemment, une équipe a rapporté que, chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine L5 prenait part directement à la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S en régulant le taux de TFIIIA dans la cellule et donc, que les quantités de L5 libre dans le cytoplasme, tout comme celles de TFIIIA, permettaient de réguler finement l'expression des gènes 5S (FU *et al.* 2009; HAMMOND *et al.* 2009). La conclusion de ces travaux sera développée plus en détail dans le chapitre III concernant TFIIIA (Cf. chapitre TFIIIA IV.2.2). Ceci appuie l'hypothèse de

l'importance des interactions de l'ARNr 5S avec ces différentes protéines impliquées dans la régulation de son expression, comme chez le xénope.

III. Les gènes d'ARNr 5S

III.1. Organisation des gènes d'ARNr 5S

Les gènes d'ARNr 5S sont organisés sous forme d'unités répétées en tandem, en orientation directe. Le nombre de répétitions varie généralement selon la taille du génome et donc de l'organisme, pouvant aller de 8 répétitions chez *E. coli* (CONDON *et al.* 1995) à quelques centaines chez l'Homme (SORENSEN and FREDERIKSEN 1991) ou la drosophile (WIMBER and STEFFENSEN 1970) et jusqu'à près de 60000 chez *Linum usitatissimum* (SCHNEEBERGER *et al.* 1989). Chez *Arabidopsis thaliana*, ce sont environ 1000 copies de gènes d'ARNr 5S qui sont retrouvées par génome haploïde, représentant 0,7% du génome (CAMPELL *et al.* 1992).

Chez les bactéries, tous les gènes d'ARNr font partie de la même unité de transcription, ils sont transcrits en un grand précurseur qui sera par la suite clivé (CONDON *et al.* 1995). Chez certains champignons, les gènes d'ARNr 5S sont associés physiquement aux autres gènes d'ARNr (CIHLAR and SYPHERD 1980; PHILIPPSEN *et al.* 1978). Cependant, le champignon *Yarrowia Lipolytica* présente une organisation particulière des gènes d'ARNr 5S. En effet, sur 108 unités 5S, 48 sont sous une forme dicistronique puisqu'elles sont localisées à l'extrémité 3' des gènes d'ARNt. Les autres unités 5S sont, quant à elles, dispersées au sein du génome (ACKER *et al.* 2008). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes d'ARNr 5S et les gènes d'ARNr 45S sont associés (PHILIPPSEN *et al.* 1978). A l'inverse, chez les eucaryotes supérieurs, mais aussi chez *Schizosaccharomyces pombe* (MAO *et al.* 1982) et chez *Neurospora crassa* (SELKER *et al.* 1981), les gènes d'ARNr 5S ne sont pas physiquement liés aux autres gènes d'ARNr.

III.2. Localisation des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

Dans tous les eucaryotes étudiés, les gènes d'ARNr 5S ont la particularité d'être situés dans les régions péricentromériques ou subtélomériques des chromosomes c'est-à-dire dans des régions hétérochromatiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, des techniques d'hybridation *in*

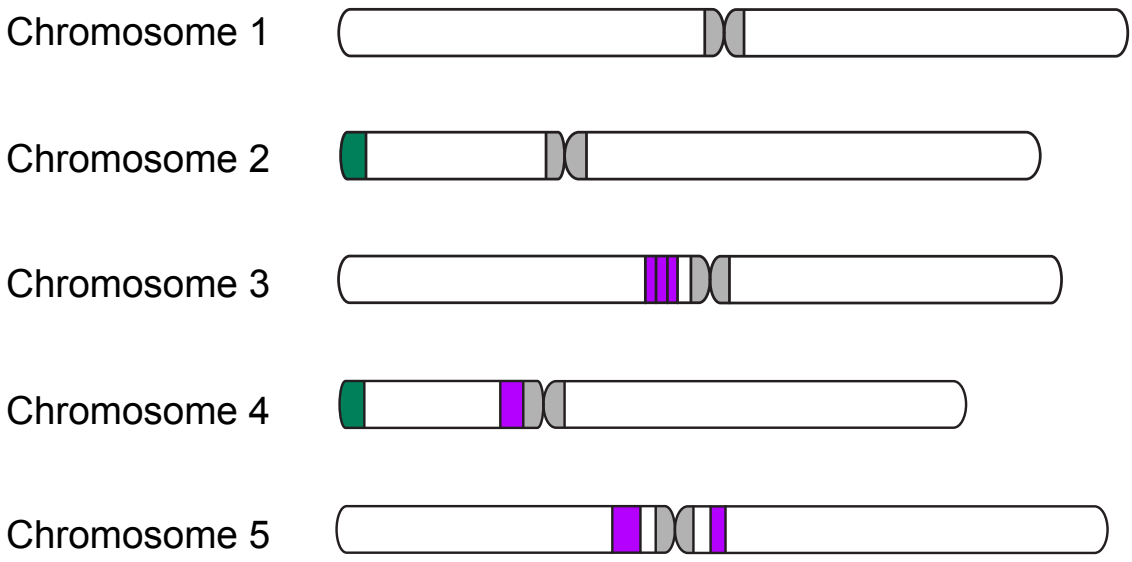


Figure 4 : Localisation des loci d'ADNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia.
Les loci d'ADNr 5S sont situés en région péricentromérique des chromosomes 3, 4 et 5. Les loci d'ADNr 5S sont en violet, les loci d'ADNr 45S sont en vert. Les centromères sont symbolisés en gris.

Tableau 1 : Les promoteurs reconnus par l'ARN polymérase III.
(D'après Paule and White, 2000)

Promoteurs ARN pol III	Gènes	Motifs du promoteur
Type I	ARNr 5S	Promoteur interne Boites A, C Elément Intermédiaire (IE)
Type II	ARNt	Promoteur interne Boites A, B
Type III	7SK, U6 (homme)	Eléments ESD, ESP boîte TATA

situ (FISH), sur des chromosomes mitotiques et méiotiques, ont permis de positionner les gènes d'ARNr 5S dans plusieurs écotypes. Dans tous les écotypes testés, le chromosome 4 porte un locus d'ADNr 5S sur son bras court et deux blocs d'ADNr 5S sont présents sur le chromosome 5 : un grand locus sur le bras gauche et un petit locus sur le bras droit (FRANSZ *et al.* 1998; MURATA *et al.* 1997). Dans les écotypes Columbia, *Landsberg erecta* ou Cape Verde Islands, un quatrième bloc d'ADNr 5S est retrouvé sur le chromosome 3 alors qu'il est absent dans C24 et Wassileskija (FRANSZ *et al.* 1998). Les loci d'ADNr 5S ont la particularité d'être situés en région péricentromérique, ils sont dans un contexte hétérochromatique, tout comme les gènes codant pour les trois autres ARNr (45S) situés aux extrémités télomériques des chromosomes 2 et 4 (Figure 4). Sur ce point, le locus 5S du chromosome 3 se distingue des autres loci d'ADNr 5S puisqu'il présente un polymorphisme de position selon l'écotype étudié. En effet, dans Columbia et dans les autres écotypes où il est présent, ce locus est bien situé dans la région péricentromérique du chromosome 3 alors qu'il est situé au milieu du bras droit du chromosome 3 dans *Landsberg erecta* (FRANSZ *et al.* 1998; TUTOIS *et al.* 2002).

III.3. Structure de l'unité génique d'ADNr 5S

Les gènes d'ARNr 5S sont composés d'une région transcrite de 120 pb et d'une région intergénique de taille variable selon les organismes. Chez les eucaryotes, ces gènes sont transcrits par l'ARN polymérase III qui reconnaît des promoteurs variés présentant tout de même une organisation basale conservée. Ces promoteurs sont classés en trois catégories (Type 1–3) (Tableau 1). Le promoteur des gènes 5S est de type 1, c'est-à-dire qu'il est composé d'un promoteur interne tripartite, suffisant à la transcription chez le xénope (PIELER *et al.* 1987), mais également de séquences régulatrices situées dans l'espaceur intergénique qui sont requises pour une efficacité optimale. La seule exception connue à cette organisation tripartite du promoteur des gènes 5S concerne *S.cerevisiae* dont le promoteur est uniquement constitué de la boîte C (CHALLICE and SEGALL 1989).

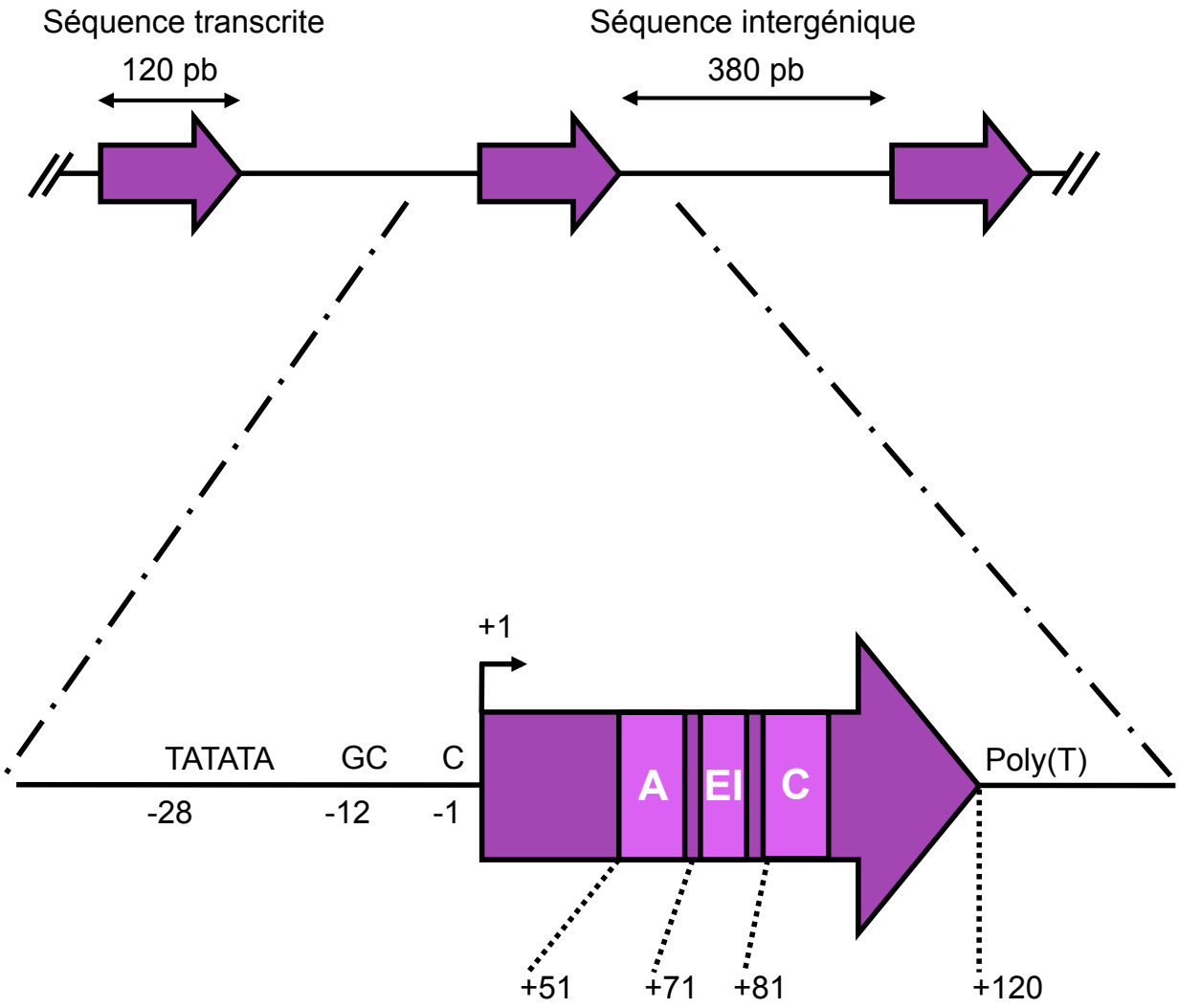


Figure 5 : Représentation schématique des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*.
Haut: Les gènes d'ARNr 5S sont répétés en tandem. Les séquences transcrites de 120 pb sont séparées par une séquence intergénique de 380 pb.
Bas: Le promoteur interne est composé d'une boîte A, d'un élément intermédiaire (EI) et d'une boîte C. Les séquences en amont de la séquence transcrite sont indispensables à la transcription. Une séquence poly(T), terminatrice de la transcription, est située en aval de la séquence transcrite de 120 pb.

III.3.1. Le promoteur interne

Les premières études concernant les séquences régulatrices de la transcription des gènes d'ARNr 5S ont été menées chez le xénope. Elles ont permis d'identifier trois régions : la boîte A, l'élément intermédiaire EI et la boîte C (Figure 5). Ces trois éléments formant le promoteur interne ou ICR (pour Internal Control Region) sont suffisants pour permettre le recrutement du complexe de transcription composé de TFIIIA, TFIIIB, TFIIIC et de l'ARN polymérase III (PIELER *et al.* 1985a; PIELER *et al.* 1985b). Grâce aux données de séquences accumulées chez le xénope (BOGENHAGEN *et al.* 1980; PIELER *et al.* 1985b; SAKONJU *et al.* 1980) et à des expériences de transcription *in vitro*, les éléments du promoteur interne des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* ont pu être définis (CLOIX *et al.* 2000; CLOIX *et al.* 2003). La boîte A se situe entre les positions +51 et +62, l'élément EI entre les positions +71 et +72 et la boîte C est retrouvée entre les positions +81 et +90.

III.3.2. La région 5'

Plusieurs études *in vitro* menées chez *Bombyx mori* (MORTON and SPRAGUE 1984), *Caenorhabditis elegans* (NELSON *et al.* 1998), *Drosophila melanogaster* (SHARP and GARCIA 1988) ont montré que, bien que l'ICR soit suffisant pour la transcription des gènes d'ARNr 5S, la région 5' du gène est requise pour une transcription efficace de ces gènes. En effet, chez le xénope notamment, une délétion de seulement 5 nucléotides en amont de la séquence transcrite des gènes 5S somatiques (il y a deux familles d'ARNr 5S chez le xénope, Cf. IV.2.) réduit de deux fois la transcription de ces gènes (WORMINGTON *et al.* 1981). Une séquence de 26 pb a pu ainsi être identifiée comme nécessaire à la transcription des gènes d'ARNr 5S. Elle contient un motif TATAT, ressemblant à une boîte TATA du système de transcription de l'ARN polymérase II.

Bien que les gènes d'ARNr 5S soient hautement conservés, il existe une variabilité au niveau de l'importance ou de la nature même des séquences régulatrices en 5'. Chez l'amibe, *Acanthamoeba castellanii*, il a été démontré que la suppression de la séquence de type « TATA-like » n'altère que faiblement la transcription (PENG and BATEMAN 2004). Chez les mammifères, cette séquence « TATA-like » est remplacée par une séquence de 12 pb riche

```
                                +121
                                ⋮
Chr.3 locus 1          ---TTTTTTTCGGTTTTCTCTTTTTTTTTGTC---
Chr.3 locus 2          ---TTTTTT-CGGTTTTCTCTTTTTTTTTGTT---
Chr.3 locus 3          ---TTTTTTTCGGTTTTCTCTTTTTTTTTGTT---
Chr.4                  ---TTTTTTTTTTTTTTTTTTT------GGTT---
Chr.5 locus majeur     ---TTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTT-GGTT---
Chr.5 locus mineur     ---TTTTTTTTTAATTTGTTTTTTT---GGTT---
```

Figure 6 : Signatures des différents loci 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia.

Les séquences « signature » correspondent au stretch de T situé à l'extrémité 3' de tous les gènes d'ARNr 5S, en +121. Ce stretch de T est constitué d'une répétition de résidus T dont la longueur et les motifs sont spécifiques à chaque locus. Les différences majeures entre ces différents stretch sont en rouge.

(D'après Cloix *et al.*, 2000)

en GC, la boîte D. *In vitro*, cette boîte D est nécessaire à une transcription efficace des gènes d'ARNr 5S humain (HALLENBERG *et al.* 1994; NIELSEN *et al.* 1993).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les éléments régulateurs en amont de la séquence transcrite ont été définis, comme pour le promoteur interne, par homologie de séquences. Un motif « TATA-like » entre les positions -28 et -23, un dinucléotide GC en -12 et un résidu C en -1 ont pu être identifiés (VENKATESWARLU *et al.* 1991) (Figure 5). Cloix *et al*. ont par la suite confirmé la position de ces séquences ainsi que leur importance dans la transcription des gènes d'ARNr 5S dans l'écotype Columbia grâce à des expériences de transcription *in vitro* (CLOIX *et al.* 2003). Ces études ont de plus démontré le caractère essentiel de la boîte « TATA-like » dans la transcription et dans la ré-initiation de la transcription des gènes d'ARNr 5S.

III.3.3. La région 3'

Alors que l'ARN pol III reconnaît différents promoteurs pour l'initiation de la transcription, elle la termine grâce à une simple séquence consensus retrouvée à la fin de tous les gènes reconnus par cette machinerie transcriptionnelle. Bogenhagen et Brown (1981) ont identifié un cluster de T nécessaire à la terminaison de la transcription des gènes d'ARNr 5S ovocytaires chez *Xenopus laevis* (BOGENHAGEN and BROWN 1981). La longueur du stretch de T varie selon les organismes. Chez la levure, le stretch de T est généralement composé de 6 ou 7 T (ALLISON *et al.* 1991; HAMADA *et al.* 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana*, un stretch de T est également présent en aval de l'extrémité 3' de la séquence transcrite permettant la terminaison de la transcription (CLOIX *et al.* 2003). Ces stretchs de T diffèrent entre les gènes 5S en fonction de leur origine chromosomique (Figure 6). En effet, le nombre de T répétés varie et il peut être interrompu par des A, G ou C (CLOIX *et al.* 2000; CLOIX *et al.* 2002). Ainsi, les gènes d'ARNr 5S peuvent être distingués, par leur motif polyT, en fonction de leur appartenance au chromosome 3, 4 ou 5.

III.4. Les gènes d'ARNr et la stabilité du génome

Les gènes d'ARN ribosomique, que ce soit les 5S ou les 45S, sont présents en un grand nombre de copies qui semble être largement supérieur au besoin réel de la cellule en ARNr et ce dans tous les organismes étudiés. Cependant, ce nombre important de copies est conservé au cours de l'évolution reflétant donc l'importance pour l'organisme de maintenir ce stock de gènes d'ARNr actifs et inactifs.

Il a été suggéré que le maintien de ce nombre d'unités, largement en excès en conditions normales, pourrait permettre une adaptation de la cellule en fonction de ses besoins en ARNr. En effet, en recrutant des copies qui sont normalement inactives, l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques pourrait être augmentée et par conséquent le taux d'ARNr également. Dans ce cas, la présence d'un grand nombre de copies de gènes d'ARNr peut être considérée comme une ressource supplémentaire de gènes en fonction des besoins en ARNr. Chez *Arabidopsis thaliana*, notre équipe a montré que sur les 1000 copies d'unité 5S, une fraction des gènes d'ARNr 5S est exprimée dans tous les tissus et lorsque des quantités d'ARNr 5S plus importantes sont nécessaires, par exemple dans la graine, une autre fraction des gènes 5S est alors transcrite (MATHIEU *et al.* 2003a). Cependant, une grande partie des gènes d'ARNr 5S n'est jamais exprimée. Il semblerait donc qu'au-delà d'un rôle de réservoir, le nombre de copies excédentaires de gènes d'ARNr ait une autre fonction.

Une étude récente menée par Ide *et al*. a démontré que la présence d'un grand nombre de gènes ribosomiques était nécessaire pour la cohésion et l'association efficace des chromatides sœurs assurant ainsi la stabilité du génome (IDE *et al.* 2010). Ces auteurs ont créé des souches de levure présentant un nombre variable de gènes ribosomiques (chez la levure, l'ensemble des gènes d'ARNr fait partie d'une même unité transcriptionnelle). Ils ont ainsi montré que les levures contenant le plus petit nombre de gènes, 20 contre 150 en contexte sauvage, étaient beaucoup plus sensibles à des agents mutagènes de l'ADN tels que le methylmethanesulfonate (MMS) ou les rayons ultra-violets (UV). Les multiples copies d'ADNr assureraient l'efficacité des mécanismes de réparation par recombinaison en facilitant l'association de la condensine (complexe protéique jouant un rôle central dans le maintien de la structure des chromosomes) au niveau des gènes d'ADNr et donc la cohésion des chromatides sœurs au niveau de ces loci. En effet, les copies excédentaires d'ADNr qui

Tableau 2 : Nombre de copies gènes d'ARNr 45S par cellule haploïde
(D'après Ide *et al.*, 2009)

Espèces	Nombre de copies
E.coli	8
Saccharomyces cerevisiae	150
Drosophilia melanogaster	240
Xenopus laevis	600
Homo sapiens	350
Arabidopsis thaliana	570
Pisum sativum	3900
Zea mays	12000

ne sont pas transcrites peuvent fixer la condensine, alors que dans des souches de levure ne contenant que 20 copies, celles-ci sont toutes transcrites et l'association de condensine au niveau de ces unités est fortement diminuée. Ces souches ne peuvent alors plus réparer de façon efficace les lésions causées par des agents mutagènes tels que le MMS ou les UV.

Ide *et al.* proposent également que l'évolution du nombre de copies d'ADNr soit corrélée à la taille de la cellule. En effet, les bactéries qui sont considérablement plus petites que les cellules eucaryotes, n'ont que quelques copies dispersées au sein du génome comparé aux organismes eucaryotes. De plus, les cellules plus grosses ont des besoins en ribosomes plus importants et par conséquent en ARNr, ceci justifie le fait que plus les cellules sont grosses, plus le nombre de copies de gènes d'ARNr est grand (Tableau 2). Les ARNr étant indispensables à la survie de la cellule, la présence d'un grand nombre de copies de gènes d'ARNr diminue la sensibilité de la cellule vis-à-vis d'agents mutagènes.

Le nombre important de gènes d'ARNr assure donc à la fois une capacité de transcription optimale et une stabilité du génome.

IV. Expression des gènes d'ARNr 5S

IV.1. Mécanisme transcriptionnel de type ARN polymérase III

Chez les eucaryotes, les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par l'ARN polymérase III, qui est également impliquée dans la transcription de plusieurs centaines de gènes dont la majorité code pour les ARNt. Mais, elle est aussi à l'origine de l'ARN 7SL, de l'ARNsn U6 et de plusieurs petits ARN impliqués dans des processus de maturation, ainsi que de la transcription d'éléments transposables comme l'élément Alu (PAULE and WHITE 2000).

Classiquement, la machinerie transcriptionnelle de type pol III fait intervenir les facteurs de transcription TFIIIC et TFIIIB. La transcription des gènes d'ARNr 5S requiert l'intervention d'un troisième facteur de transcription spécifique, TFIIIA. Ces trois facteurs de transcription interagissent avec les gènes d'ARNr 5S dans un ordre défini. Dans un premier temps, TFIIIA se lie de façon spécifique au promoteur interne du gène, recrutant ensuite TFIIIC, puis TFIIIB. Le complexe de transcription ainsi formé, va permettre à l'ARN polymérase III d'initier la transcription (BIEKER *et al.* 1985; KASSAVETIS *et al.* 1990; SETZER and

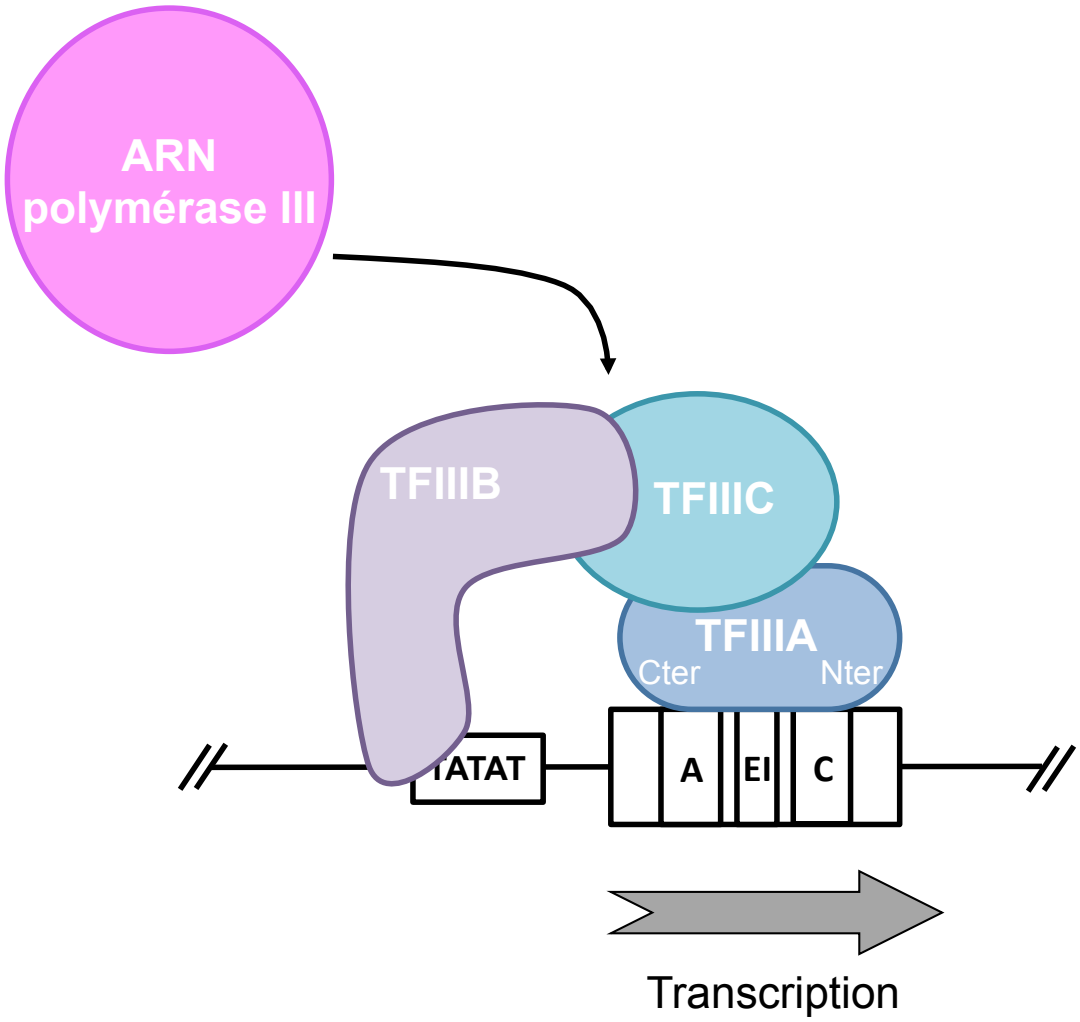


Figure 7 : Formatio` du complexe de tra` scriptio` pol III au ` iveau d'u` gè` e d'ARNr 5S.
La fixation de TFIIIA sur le promoteur interne d'une unité 5S, au niveau des boîtes A et C et de l'élément EI, permet le recrutement du complexe TFIIIC. Ainsi complexé, TFIIIC va pouvoir recruter TFIIIB. L'ARN polymérase III va alors pouvoir initier la transcription.

BROWN 1985) (Figure 7). La plupart des connaissances concernant le mécanisme de transcription des gènes d'ARNr 5S provient d'études réalisées chez *Xenopus laevis* (BIEKER *et al.* 1985; KASSAVETIS *et al.* 1990; SETZER and BROWN 1985), et ont été par la suite confirmées et complétées chez *Saccharomyces cerevisiae* (KASSAVETIS *et al.* 1990). Cependant, aucune étude concernant le mécanisme transcriptionnel pol III n'a été menée chez *Arabidopsis thaliana*.

IV.1.1. Le facteur de transcription TFIIIA

TFIIIA est une protéine constituée de 9 doigts de zinc qui se lient à l'ICR des gènes 5S et d'un domaine C-terminal « non-DNA binding » lui permettant d'interagir avec les autres facteurs de transcription. Cette protéine a de plus, comme décrit précédemment (Cf. II.3), la capacité de lier son propre produit de transcription, l'ARNr 5S. Ce facteur de transcription a été particulièrement bien décrit chez le xénope.

TFIIIA est le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S, il sera décrit plus en détail par la suite dans le chapitre II.

IV.1.2. Le facteur de transcription TFIIIC

TFIIIC est un des plus gros facteurs de transcription connus. En effet, chez *Xenopus laevis*, un complexe TFIIIC de 400 kDa a été purifié et cinq polypeptides le composant ont été isolés (KELLER *et al.* 1992). Chez *saccharomyces*, où ce complexe est très bien caractérisé, il fait plus de 500 kda et est composé de six sous-unités (BARTHOLOMEW *et al.* 1990; GABRIELSEN *et al.* 1989; PARSONS and WEIL 1990), tout comme TFIIIC chez *Bombyx mori*, où cependant seuls cinq polypeptides ont été identifiés (SRINIVASAN and GOPINATHAN 2002). Chez l'homme, ce complexe est composé de 6 sous-unités (DUMAY-ODELOT *et al.* 2007; KOVELMAN and ROEDER 1992; YOSHINAGA *et al.* 1989) dont trois d'entre elles possèdent une activité histone acétyltransférase permettant ainsi de lever la répression nucléosomale *in vitro* (HSIEH *et al.* 1999; KUNDU *et al.* 1999).

Par sa fixation sur TFIIIA, TFIIIC va stabiliser le complexe binaire TFIIIA/ADNr 5S (SETZER and BROWN 1985), puis recruter TFIIIB. Il est donc considéré comme un co-activateur puisqu'il permet le lien entre TFIIIA qui lie spécifiquement l'ADNr 5S et TFIIIB qui va permettre le recrutement de l'ARN polymérase III. Il est important de noter que lors de la

transcription des autres gènes transcrits par l'ARN polymérase III, par exemples les gènes d'ARNt, le complexe TFIIIC se lie directement au promoteur de ces gènes en fixant les boîtes A et B, et permet donc l'initiation de la transcription.

Plus récemment, il a été mis en évidence que TFIIIC possédait des activités extra-transcriptionnelles. En effet, TFIIIC peut se lier à des séquences sans recruter les autres acteurs de la machinerie de transcription ARN pol III (MOQTADERI and STRUHL 2004; NOMA *et al.* 2006; SIMMS *et al.* 2008; VALENZUELA *et al.* 2009). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ces sites de fixation sont nommés ETC pour Extra-TFIIIC (MOQTADERI and STRUHL 2004). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, Noma *et al.* ont mis en évidence des sites COC (Chromosome Organizing Clamps) où TFIIIC se lie sans recruter l'ARN pol III (NOMA *et al.* 2006). L'étude des sites COC, chez *S.pombe*, montre que TFIIIC se localise au niveau de zones frontières de régions hétérochromatiques telles que le locus MAT (Mating type, déterminant du type sexuel). En effet, ces séquences contiennent des boîtes B (composant des promoteurs de type 2 de la machinerie pol III). TFIIIC va donc pouvoir se fixer au niveau de ces boîtes B. Cependant, l'absence de boîte A dans ces séquences pourrait empêcher le positionnement classique de TFIIIC et donc le recrutement de TFIIIB et de l'ARN polymérase III. Des expériences d'immmunofluorescence ont mis en évidence la présence de 5 à 10 foci TFIIIC (hautes concentrations de TFIIIC en absence d'ARN pol III) localisés à la périphérie nucléaire d'une cellule. Ces protéines TFIIIC sont associées, en plus du locus MAT, aux centromères et à plusieurs sites COC. Chez *S. cerevisiae*, il a, par la suite, été démontré que ces sites ETC sont capables de bloquer l'expression de gènes rapporteurs lorsqu'ils sont placés entre le site de fixation du facteur de transcription du gène rapporteur et de son promoteur. Dans ce contexte, les ETC peuvent être considérés comme des insulateurs (SIMMS *et al.* 2008). Simms *et al.* ont également montré que, dans leur contexte naturel, les ETC fonctionnent comme des « barrières » de l'hétérochromatine.

TFIIIC, en plus de son rôle dans le complexe de transcription ARN pol III, participerait à limiter la propagation de l'hétérochromatine et donc à l'organisation du génome.

IV.1.3. Le facteur de transcription TFIIIB

Chez les eucaryotes supérieurs et la levure, TFIIIB est formé de l'association de trois polypeptides : une TBP (TATA binding protein) (KASSAVETIS *et al.* 1991; WHITE *et al.* 1992), essentielle à la transcription de l'ensemble des gènes eucaryotes et donc hautement conservée (HERNANDEZ 1993; RIGBY 1993) et deux protéines TAFs (TBP-associated factors). TFIIIB n'ayant pas la capacité de reconnaître directement le promoteur de l'ADNr 5S, est recrutée grâce à des interactions protéines/protéines avec le complexe TFIIIC/TFIIIA/ADNr 5S (KASSAVETIS *et al.* 1990). La protéine TBP qui fait partie de ce complexe va alors pouvoir se fixer au niveau du site « TATA-like » en amont de la séquence transcrite (JOAZEIRO *et al.* 1994) ; elle stabilise également la fixation d'une des protéines TAFs, TAF70 ou BRF (TFIIB-related factor) sur TFIIIC entraînant le recrutement de la deuxième TAF, TAF90 (KASSAVETIS *et al.* 1992). Des expériences de délétion au niveau des TAFs ont montré que TAF90 participait à l'ouverture du promoteur en initiant la séparation des brins d'ADN en amont de la bulle de transcription et que TAF70 permettait sa propagation (KASSAVETIS *et al.* 2001). La fixation stable de TFIIIB au niveau des gènes d'ARNr 5S permet alors l'arrivée de l'ARN polymérase III. Un fois que TFIIIB est positionné en amont du site de transcription, TFIIIA et TFIIIC ne sont plus indispensables à la transcription *in vitro* (KASSAVETIS *et al.* 2001). En effet, TFIIIB est le seul facteur qui permet le positionnement correct de l'ARN pol III et donc l'initiation de la transcription (KASSAVETIS *et al.* 1990).

IV.2. Régulation développementale de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus laevis*

Il existe chez le xénope, deux familles multigéniques de gènes d'ARNr 5S, physiquement séparées : les gènes ovocytaires, majoritaires en nombres de copies puisqu'un génome haploïde en contient 20 000 et les gènes somatiques, présents en 400 copies (PETERSON *et al.* 1980). De nombreuses études ont montré qu'une expression différentielle des gènes d'ARNr 5S ovocytaires et somatiques se met en place au cours du développement. En effet, l'ovocyte de xénope accumule des réserves importantes de protéines, de facteurs de transcription ou de traduction, et d'ARN dont l'ARNr 5S et ce, en préparation des premières divisions cellulaires rapides et successives qui auront lieu sans

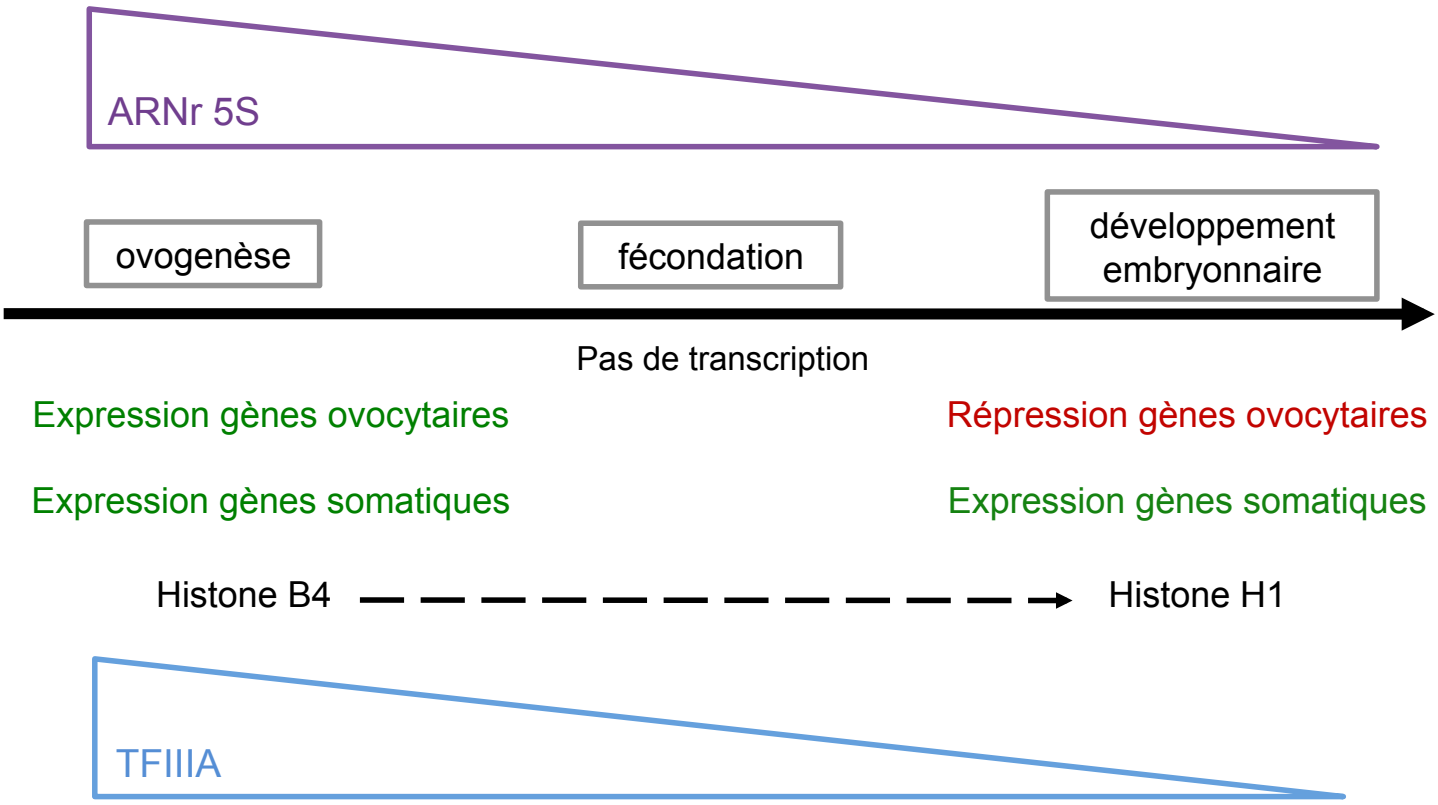


Figure 8 : Représentation schématique de l'expression des deux familles de gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus laevis,* au cours du développement.
Pendant l'ovogenèse, de fortes quantités d'ARNr 5S sont accumulées dans l'ovocyte. Les deux familles de gènes 5S, ovocytaire et somatique, sont exprimées. Après la fécondation, lorsque l'histone B4 est remplacé par l'histone H1, seuls les gènes somatiques sont exprimés, et les quantités d'ARNr 5S sont beaucoup moins importantes. L'accumulation du facteur de transcription TFIIIA suit celle des ARNr 5S.

transcription après la fécondation (WOLFFE and BROWN 1988). Les ARNr 5S accumulés durant l'ovogénèse proviennent principalement des gènes d'ARNr 5S ovocytaires, fortement actifs à ce moment-là et qui seront réprimés après la fécondation. Alors que l'expression des gènes ovocytaires est restreinte à l'ovogénèse, l'expression des gènes somatiques est, quant à elle, constitutive (Figure 8).

IV.2.1. Implication des facteurs de transcription dans l'expression différentielle des gènes d'ARNr 5S ovocytaires et somatiques chez le xénope

Bien que les séquences intergéniques de ces deux types de gènes soient complètement différentes, les éléments régulateurs de l'expression de ces gènes en 5' et en 3' de la séquence transcrite, sont conservés. Ces gènes partagent également les mêmes facteurs de transcription. La différence la plus notable entre les gènes somatiques et ovocytaires est la présence de 5 substitutions nucléotidiques dans le promoteur interne dont 3 touchent la boîte A qui permet le recrutement des facteurs de transcription (REYNOLDS and AZER 1988). Malgré ces différences, TFIIIA, qui est spécifique des gènes 5S, se lie aux gènes somatiques et ovocytaires avec la même affinité. La différence d'expression de ces gènes pourrait être due, au moins en partie, au niveau d'accumulation des facteurs de transcription. En effet, *in vivo*, l'accumulation de TFIIIA semble suivre l'activité des gènes ovocytaires (GINSBERG *et al.* 1984). TFIIIA est très abondant dans l'ovocyte et une réduction de sa concentration durant le développement embryonnaire pourrait jouer un rôle dans la perte d'activité transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S ovocytaires (Figure 8). Toutefois, des expériences *in vitro* ont montré que les taux de TFIIIA seuls ne pouvaient pas induire le changement d'expression des gènes ovocytaires (WOLFFE and BROWN 1988).

A la fin de l'ovogénèse, la protéine TFIIIA est phosphorylée par la kinase CK2, connue pour jouer un rôle dans plusieurs processus biologiques (WESTMARK *et al.* 2002). Il semblerait que cette phosphorylation soit importante pour la répression des gènes ovocytaires à la fin de l'ovogénèse. En effet, la surexpression de TFIIIA phosphorylée ne stimule pas la transcription des gènes 5S, contrairement à ce qui est observé lors de la surexpression de TFIIIA non-phosphorylée. L'hypothèse formulée par les auteurs est que cette phosphorylation de TFIIIA perturberait ses interactions avec les autres facteurs de

transcription au niveau des gènes ovocytaires même si, *in vitro*, aucune affinité différentielle de TFIIIA phosphorylée pour ces gènes n'a été démontrée (GHOSE *et al.* 2004).

IV.2.2. Les gènes ovocytaires sont réprimés par la structure chromatinienne après l'ovogénèse

Malgré tout, le principal médiateur de la transcription des gènes d'ARNr 5S chez le xénope, durant la gastrulation reste la chromatine. L'histone linker H1 a un rôle dans l'établissement d'un état de chromatine transcriptionnellement inactive pour un grand nombre de gènes (ADAMS and WORKMAN 1993). L'histone H1 est considérée comme le répresseur de l'expression des gènes d'ARNr 5S ovocytaires du xénope (Figure 8).

Pendant l'ovogénèse, les protéines H1 sont absentes mais les ARNm de l'histone H1 sont présents, stockés sous une forme complexée à des protéines empêchant leur traduction (BOUVET *et al.* 1994; DIMITROV *et al.* 1993; WOLFFE 1989). Ils ne seront traduits qu'après la fécondation (WOODLAND *et al.* 1979). Dans l'ovocyte, H1 est donc remplacée par un variant d'histone, B4 (SMITH *et al.* 1988). Après la fécondation, l'histone H1 s'accumule et ce, en corrélation directe avec la perte d'accessibilité de l'ARN polymérase III à l'ADN des gènes ovocytaires et avec la répression de ces gènes (DIMITROV *et al.* 1993; WOLFFE 1989). De plus, des expériences *in vivo* ont permis de montrer que lorsque l'expression de l'histone H1 est abolie dans des cellules somatiques, les gènes ovocytaires sont exprimés dans ces cellules (BOUVET *et al.* 1994; KANDOLF 1994).

Dans les cellules somatiques, des expériences de digestion à la nucléase micrococcale ont montré que les gènes ovocytaires réprimés sont protégés de la digestion par la présence de nucléosomes et qu'au contraire, les gènes somatiques sont sensibles à cette digestion au niveau des régions reconnues par les facteurs de transcription comme l'ICR et la région 5' (CHIPEV and WOLFFE 1992). Plus précisément, la fixation de l'histone H1 sur les gènes somatiques positionne les nucléosomes de façon à rendre accessible le promoteur aux facteurs de transcription alors que sur les gènes ovocytaires, sa fixation entraîne un positionnement des nucléosomes rendant inaccessibles les séquences régulatrices de l'expression (SERA and WOLFFE 1998). Les gènes ovocytaires possèdent une région flanquante de la séquence transcrite, de plusieurs centaines de paires de bases, riche en AT alors que cette séquence flanquante chez les gènes somatiques est riche en CG (PETERSON *et al.* 1980).

Tomaszewski *et al.* ont montré que ces séquences riches en AT étaient indispensables à la liaison correcte de l'histone H1 au niveau des gènes 5S ovocytaires afin d'induire leur répression (TOMASZEWSKI and JERZMANOWSKI 1997; TOMASZEWSKI *et al.* 1998).

Même si le concept d'épigénétique n'était pas encore utilisé, ces résultats ont révélé l'existence d'une régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez le xénope, au travers de la chromatine d'ADNr 5S.

IV.3. Variabilité d'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

IV.3.1. Tous les loci 5S ne sont pas exprimés

La cartographie de chromosomes artificiels de levure (YAC, Yeast Artificial Chromosome) et de chromosomes artificiels de bactéries (BAC, bacterial Artificial Chromosome) contenant les différents loci d'ADNr 5S a été réalisée (AGI 2000; CLOIX *et al.* 2000; TUTOIS *et al.* 1999). Ces YAC ont été utilisés comme matrice pour des amplifications PCR utilisant des amorces établies selon la séquence consensus d'ADNr 5S décrite par Cambell *et al.* en 1992. Les séquences des produits PCR ainsi obtenues ont permis d'établir une nouvelle séquence consensus pour les gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis et de mettre en évidence un polymorphisme de séquence entre les différents blocs d'ADNr 5S (CLOIX *et al.* 2000). Certains blocs sont plus touchés que d'autres par ce polymorphisme de séquence, plus important au niveau de la séquence intergénique (380 pb) que de la séquence transcrite (120 pb), les séquences du locus du chromosome 4 et du grand locus du chromosome 5 étant les plus homogènes. Le polymorphisme le plus intéressant, observé lors de cette étude, est la longueur du stretch de T ainsi que la nature variable de sa séquence (interruption ou non par des A, C ou G) puisqu'il permet de définir l'appartenance d'un gène d'ARNr 5S à tel ou tel locus (Figure 6).

Des variants de longueur des unités 5S sont retrouvés dans plusieurs plantes comme la betterave sucrière (SCHMIDT and HESLOP-HARRISON 1993) ou encore le blé et le seigle (VAN CAMPENHOUT *et al.* 1998). Ce même type de polymorphisme a également été révélé chez Arabidopsis. Par exemple, la longueur d'une unité 5S varie entre 498 pb sur le chromosome 4 et 506 pb si elle provient du grand locus du chromosome 5, la longueur de la séquence transcrite restant, elle, identique entre les différents loci. De plus, au sein du locus mineur

du chromosome 5, des variants de 251 pb dispersés au milieu d'unités de 0,5 kb ont été amplifiés. La taille plus courte des variants de 251 pb résulte d'une délétion au niveau de la séquence transcrite et de l'espaceur intergénique. Des études de transcription *in vitro* en cellules de tabac, ont montré que les unités du chromosome 3 ainsi que celles du petit locus du chromosome 5 ne pouvaient être exprimées, ce qui a été confirmé par l'analyse des transcrits présents *in vivo* (CLOIX *et al.* 2002; MATHIEU *et al.* 2003a). L'absence de transcription de ces gènes d'ARNr 5S est sans doute due à un trop grand nombre de mutations dans la séquence transcrite qui contient l'ICR de ces gènes ou au niveau des séquences régulatrices. En effet, plus de 85% des gènes d'ARNr 5S du chromosome 3 contiennent un motif TAGA (ou TACA dans quelques cas) à la place du motif TATA de la boîte « TATA-like » indispensable à la transcription (CLOIX *et al.* 2002).

L'ensemble de ces résultats montre que seules des unités 5S provenant des blocs les moins mutés (chromosome 4 et grand locus du chromosome 5) sont transcrites. Qui plus est, ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le nombre d'unités 5S total excède largement le nombre d'unités requis pour transcrire suffisamment d'ARNr 5S, et donc que tous les gènes d'ARNr 5S ne sont pas transcrits.

IV.3.2. Toutes les unités 5S des loci du chromosome 4 et du grand locus du chromosome 5 ne sont pas exprimées

Des expériences de RT-PCR suivies d'un séquençage ont été réalisées sur différents tissus et organes, afin d'étudier l'expression des différents gènes d'ARNr 5S au cours du développement. Cette étude a permis de révéler l'existence de deux populations d'ARNr 5S chez Arabidopsis. La première, quantitativement majoritaire, est constituée d'ARNr 5S identiques à la séquence transcrite consensus, ils sont dits majoritaires. La deuxième population quant à elle, est constituée d'un ensemble d'ARNr 5S hétérogènes portant 1 à 2 substitutions. Ils résultent des gènes d'ARNr 5S minoritaires (CLOIX *et al.* 2002). Alors que les transcrits majoritaires sont retrouvés dans l'ensemble de la plante, les ARNr 5S minoritaires sont absents des tissus aériens d'une plante adulte sauvage et ne sont présents que dans quelques tissus, comme la graine ou les racines où de fortes quantités d'ARNr 5S sont accumulées (MATHIEU *et al.* 2003a). Tout comme les ARNr 5S majoritaires, les « minoritaires » sont intégrés au ribosome puisqu'ils ont été retrouvés dans les polysomes, suggérant ainsi

leur fonctionnalité (CLOIX *et al.* 2002). Une hétérogénéité des transcrits 5S a également été rapportée dans de nombreux organismes tels que les bactéries (JARRY and ROSSET 1971), les champignons (WILDEMAN and NAZAR 1982), les mammifères (RO-CHOI *et al.* 1971) et le xénope (PETERSON *et al.* 1980). Comme précédemment expliqué en IV.2., chez *Xenopus laevis*, deux familles d'ADNr 5S coexistent, les gènes somatiques et les gènes ovocytaires, présentant une régulation développementale de leur expression (WOLFFE and BROWN 1988). Notons que, chez le xénope, cette hétérogénéité des transcrits 5S, résultant de l'expression des deux familles de gènes 5S, est retrouvée dans l'ovocyte où de grandes quantités d'ARNr 5S sont générées.

Chez Arabidopsis, l'analyse des YAC par amplification PCR du locus d'ADNr 5S du chromosome 5 a permis de montrer qu'il existait une répartition non aléatoire des unités 5S majoritaires et minoritaires au sein d'un locus. En effet, un gradient de mutations est observé le long du bloc d'ADNr 5S. Ainsi, les unités minoritaires peuvent présenter jusqu'à 7 substitutions, les unités les plus mutées étant situées du côté le plus hétérochromatique du bloc (DOUET 2008).

L'analyse des transcrits 5S dans les tissus aériens d'une plante adulte sauvage *in vivo* n'a mis en évidence aucun ARNr 5S minoritaire. Cependant, des ARNr 5S minoritaires sont retrouvés dans les racines d'une plante sauvage et dans des mutants d'hypométhylation (VAILLANT *et al.* 2008). Ces résultats montrent donc qu'à l'intérieur des loci d'ADNr 5S transcrits (chromosome 4 et grand locus chromosome 5) seule la fraction majoritaire des gènes 5S est transcrite et que le reste des gènes (minoritaires) est réprimé. Ces résultats suggèrent un rôle de la chromatine dans la régulation de la transcription des unités 5S.

IV.4. Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S sont présents en environ 1000 copies par génome haploïde. Néanmoins, seule une partie des unités 5S est transcrite. En effet, l'étude des transcrits 5S décrite précédemment a montré que les ARNr 5S d'une plante adulte provenaient du bloc du chromosome 4 et du grand bloc du chromosome 5. Bien qu'effectivement, les unités du chromosome 3 et celles du petit locus du chromosome 5 n'aient pas la capacité d'être transcrites *in vitro* ou *in vivo*, l'ensemble des unités des deux

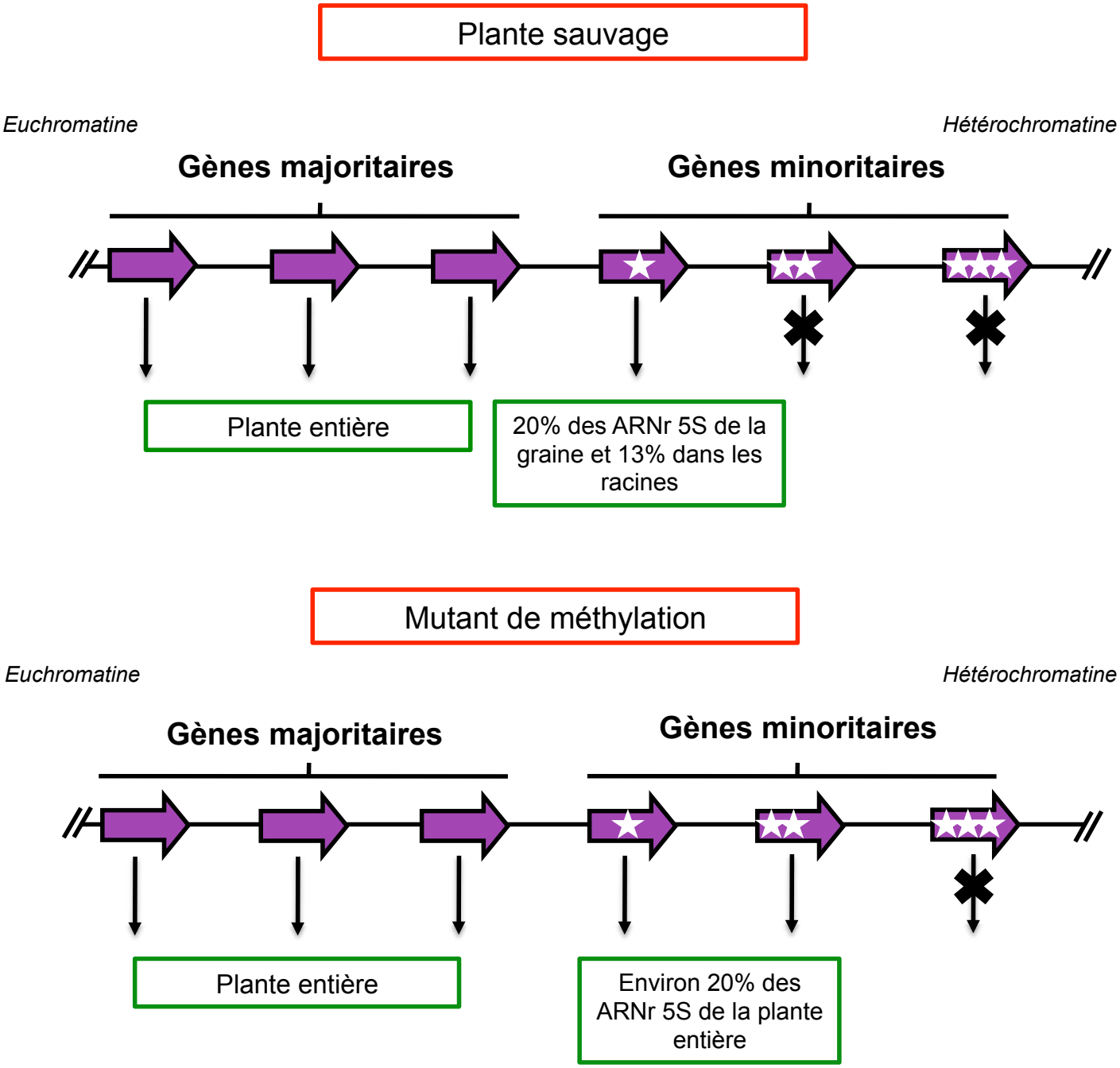


Figure 9 : Les gènes d'ARNr 5S minoritaires sont réprimés dans une plante sauvage.
Représentation schématique des gènes d'ARNr 5S répétés en tandem dans le bloc d'ADNr 5S du chromosome 5. Les étoiles symbolisent les substitutions de nucléotides au sein de la séquence transcrite des gènes d'ARNr 5S, représentée par la flèche. Le nombre de mutations est croissant le long du locus. Les gènes minoritaires sont situés dans la partie hétérochromatique du locus.
Dans une plante sauvage, seuls les ARNr 5S majoritaires sont retrouvés dans les tissus aériens. La graine et les racines accumulent 20% et 13% d'ARNr 5S minoritaires, respectivement. Dans des mutants de méthylation, certaines unités 5S minoritaires sont déréprimées. La plante accumule alors environ 20% d'ARNr 5S minoritaires.

autres loci est théoriquement transcriptionnellement compétent. Or, des expériences de RT-PCR ont révélé que seuls les gènes majoritaires étaient exprimés dans les tissus aériens d'une plante sauvage adulte. En effet, les gènes 5S minoritaires (présentant des substitutions au sein de leur séquence transcrite) ne semblent pas en mesure de s'exprimer. Au vu d'expériences menées *in vitro*, les transcrits issus de ces gènes sont pourtant stables et ils sont retrouvés *in vivo* dans certains tissus (graines et racines), contextes ou stades de développement (plantules de 2 jours) (Figure 9). L'absence d'ARNr 5S minoritaires dans la plante adulte sauvage est donc due à une répression des gènes 5S minoritaires. Du fait du positionnement hétérochromatique des gènes 5S et de leur organisation sous forme d'unités répétées en tandem, l'hypothèse d'une régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S a été développée et étudiée dans l'équipe.

IV.4.1. La méthylation des gènes d'ARNr 5S

La méthylation de l'ADN est l'un des événements majeurs à l'origine de la répression des gènes. Chez les plantes, 5 à 25% des cytosines sont méthylées (RANGWALA and RICHARDS 2004). La forte méthylation des gènes d'ARNr 5S a été montrée dans différentes espèces telles que le maïs (MASCIA *et al.* 1981), le soja (GOTTLOB-MCHUGH *et al.* 1990), le tabac (FULNECEK *et al.* 1998), le lin (GOLDSBROUGH *et al.* 1982) et *Arabidopsis thaliana* (FINNEGAN *et al.* 1996; VONGS *et al.* 1993). Chez *Xenopus laevis*, une forte méthylation a été mise en évidence aussi bien pour les gènes somatiques que pour les gènes ovocytaires (SIMS *et al.* 1983).

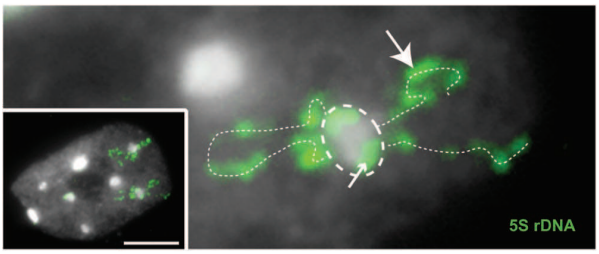
Après avoir caractérisé les gènes d'ARNr 5S d'un point de vue organisationnel chez Arabidopsis, notre équipe s'est intéressée à la méthylation de ces derniers. Par des expériences de bisulfite de sodium, Mathieu *et al.* ont donc montré que 79% des cytosines des gènes d'ARNr 5S sont méthylées qu'elles soient en contexte symétrique ou asymétrique (CG, CNG ou CNN) alors que le reste du génome ne présente que 6% de méthylation (MATHIEU *et al.* 2002; WAGNER and CAPESIUS 1981). Bien que ce taux de méthylation soit élevé et que toutes les unités 5S sont méthylées qu'elles soient ou non transcrites, certaines unités 5S présentent un taux de méthylation beaucoup plus faible que les autres. Il a été démontré qu'il existait un gradient de cytosines en contexte asymétrique le long du locus du chromosome 5. Les unités 5S les plus proches du centromère, qui ne sont jamais exprimés dans les tissus aériens d'une plante sauvage, possèdent le plus grand nombre de cytosines

en contexte CHH. Il pourrait donc exister un gradient de méthylation de cytosines asymétriques en corrélation avec l'expression des gènes d'ARNr 5S (VAILLANT *et al.* 2008).

Le système méthylation/déméthylation est connu pour assurer un contrôle dynamique de l'expression d'un grand nombre de gènes. L'impact direct de la méthylation ADN sur l'expression des gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana* a donc été testé *in vitro*, dans des extraits nucléaires de tabac. La méthylation des sites CG, obtenue par l'action d'une méthylase CG-spécifique n'entraîne pas d'inhibition de la transcription de ces gènes *in vitro*. *In vivo*, une déméthylation globale de l'ADN d'Arabidopsis obtenue en cultivant les plantes sur un milieu contenant de la 5-aza-cytidine (inhibiteur de la méthylation des cytosines) n'induit pas d'augmentation du taux global d'ARNr 5S dans la plante (MATHIEU *et al.* 2002). Les gènes déméthylés sont normalement plus accessibles à la transcription. Il existe donc certainement un facteur limitant, comme TFIIIA, initiateur de la transcription du 5S, qui ne permet pas l'augmentation de l'expression de ces gènes en contexte hypométhylé. Des expériences similaires, réalisées chez *X. laevis*, où des gènes 5S artificiellement méthylés ont été injectés dans des ovocytes, ont montré que le taux de transcription de ces gènes 5S n'était pas altéré par cette méthylation (BESSER *et al.* 1990). La méthylation des gènes 5S ne détermine donc pas, à elle seule, l'expression ou la répression des gènes d'ARNr 5S.

Chez Arabidopsis, l'étude de la méthylation des gènes 5S minoritaires et de leur expression a été menée *in vivo*. En contexte sauvage, 13% d'ARNr 5S minoritaires sont retrouvés dans la racine. Si ces mêmes plantes sont traitées par de la 5-aza-cytidine, ce pourcentage d'ARNr 5S minoritaires passe à 22,7% dans les racines. Dans un contexte mutant hypométhylé pour l'ensemble du génome, comme *ddm1* (decrease in DNA methylation 1), 22% d'ARNr 5S minoritaires sont présents dans les racines (MATHIEU *et al.* 2003a). De plus dans un mutant *sil1*, qui ne présente plus d'activité histone déacétylase HDA6, l'ADNr 5S est faiblement méthylé en CHG et les gènes d'ARNr 5S minoritaires sont déréprimés (VAILLANT *et al.* 2007). Cependant, aucune réactivation des gènes 5S minoritaires n'est observée dans un mutant pour le gène CMT3, responsable de la maintenance de la méthylation CHG (VAILLANT *et al.* 2008). Bien que la méthylation n'ait pas d'effet sur le taux global de transcription des gènes d'ARNr 5S (présence d'un autre facteur limitant tel que

A.



B.

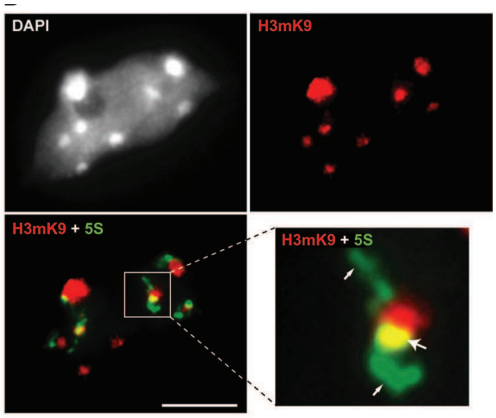


Figure 10 : Des boucles d'ADNr 5S émanent des chromocentres dans un noyau de feuille d'une plante de 3 semaines.

A. Cette image montre un grossissement d'un noyau d'une feuille de plante sauvage coloré au DAPI. Des boucles d'ADNr 5S en vert (ligne en pointillés) émanent d'un chromocentre (entouré). La petite flèche montre la partie de l'ADNr 5S qui colocalise avec l'hétérochromatine.

B. Des noyaux de feuilles de plante sauvage montrent un fort marquage H3K9me2 (noté H3mK9) en rouge. Le grossissement montre que les boucles euchromatiques d'ADNr 5S sont faiblement associée à la diméthylation H3K9 (petites flèches). Alors que l'ADNr 5S hétérochromatique est fortement marqué (grosse flèche). Il apparaît en jaune sur l'image (superposition des signaux verts et rouges).
échelle = 5 um.
(D'après Mathieu *et al*., 2003a)

TFIIIA), elle serait en partie responsable de la répression des gènes d'ARNr 5S minoritaires et ce probablement en association avec la structure de la chromatine de l'ADNr 5S.

IV.4.2. La chromatine, répresseur des gènes d'ARNr 5S minoritaires

Des expériences de FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) ont montré que l'ADNr 5S dans des feuilles de plante âgée de 3 semaines forment des boucles qui émanent de l'hétérochromatine (MATHIEU *et al.* 2003a). Ces boucles présentent un profil épigénétique de type euchromatique comme la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2) et l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Ac) ; le taux de méthylation ADN est, de plus, plus faible que celui de l'ADNr 5S colocalisant avec l'hétérochromatine. L'ADNr 5S hétérochromatique porte, lui, une marque répressive, H3K9me2 (Figure 10). Dans une plante mutante pour *ddm1*, les boucles sont de plus grandes tailles et comme il a été expliqué dans le paragraphe précédent, des gènes d'ARNr 5S minoritaires sont transcrits. Cette augmentation de la taille des « boucles 5S » est due à la décondensation de la chromatine engendrée par la mutation de DDM1, qui est une protéine de remodelage de la chromatine, de type SWI/SNF2-like. En effet, la mutation *ddm1* est connue pour entraîner à la fois une déméthylation du génome et une forte décondensation des chromocentres (SOPPE *et al.* 2002).

Ces résultats ont donc amené l'équipe a émettre l'hypothèse selon laquelle, en contexte sauvage, les gènes d'ARNr 5S minoritaires seraient situés dans la partie hétérochromatique de l'ADNr 5S qui colocalise avec les chromocentres et que les gènes 5S non mutés, dits majoritaires constitueraient les boucles euchromatiques émanant de ces foci afin d'être transcrits.

IV.4.3. La voie de méthylation RdDM contrôle l'expression des gènes d'ARNr 5S minoritaires

La voie RdDM (RNA-directed DNA methylation) est une voie de surveillance du génome basée sur l'ARN interférence ou RNAi qui a pour conséquence d'entraîner la répression des gènes ciblés. Elle détecte de façon efficace des séquences répétées et les marque afin de les rendre transcriptionnellement inactives via la production de siRNA homologues capables de diriger la méthylation ADN et la méthylation/déacétylation des

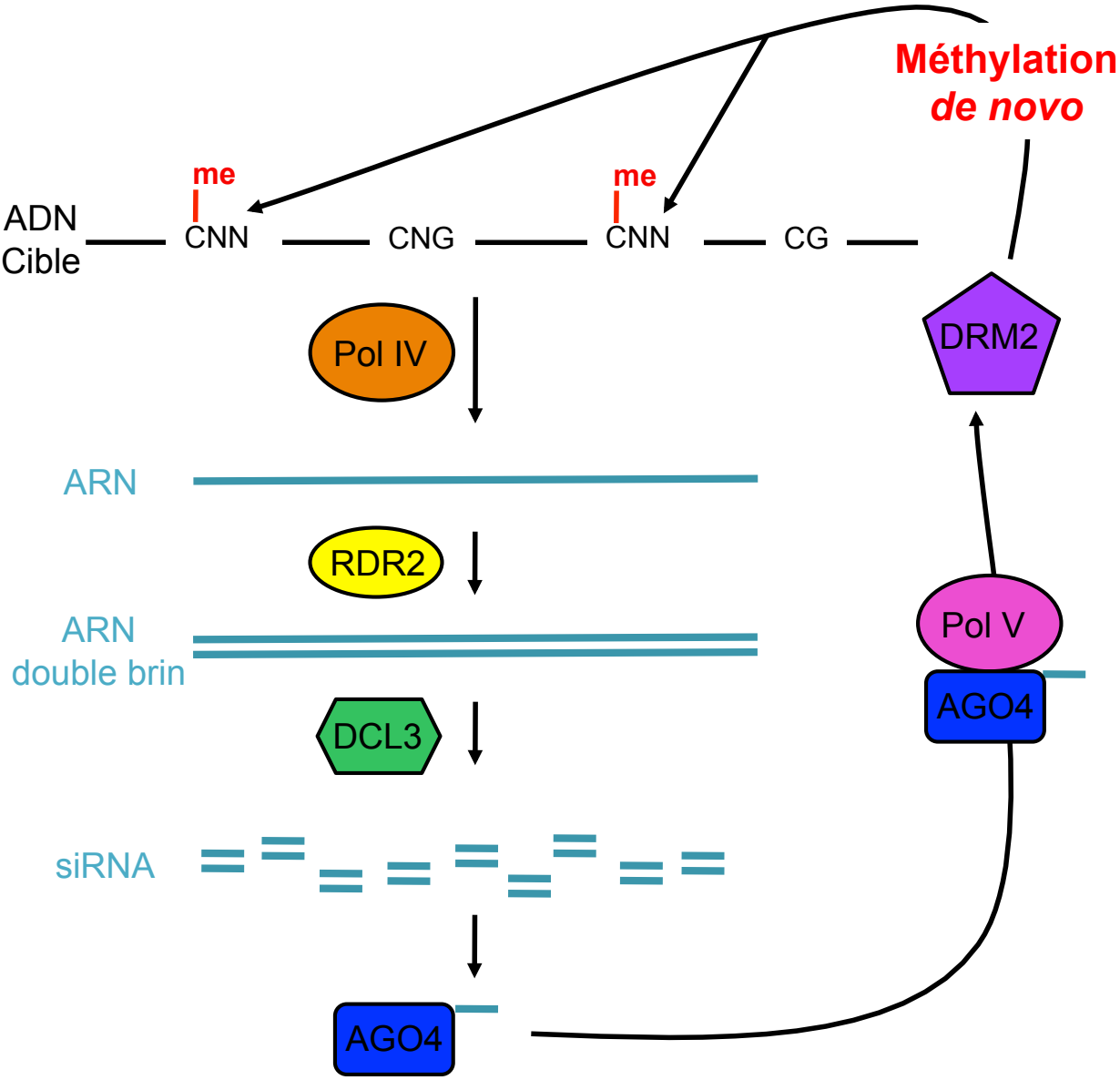


Figure 11 : Représentation schématique de la voie RdDM.
L'ADN cible est transcrit par l'ARN polymérase IV. Ce transcrit est converti par RDR2 en ARN double brin, qui sera clivé en siRNA par DCL3. AGO4 prend en charge ces siRNA et interagit avec l'ARN polymérase V afin de guider DRM2 qui va méthyler les cytosines asymétriques de l'ADN cible.

histones (HERR *et al.* 2005; KANNO *et al.* 2005; MATZKE and BIRCHLER 2005; ONODERA *et al.* 2005; PONTIER *et al.* 2005). La marque caractéristique de cette voie est la présence de méthylation ADN sur des cytosines situées en contexte asymétrique (PELISSIER *et al.* 1999). Chez les plantes, la voie RdDM est la voie principale de « silencing nucléaire ».

Les ARN polymérases IV et V sont les deux composants clés de cette voie, elles y jouent des rôles complémentaires (Figure 11). Dans un premier temps, l'ARN pol IV produit, à partir de la séquence cible, un ARN simple brin qui sera converti en un ARN double brin par RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase 2) puis maturé par DCL3 (Dicer-Like protein 3) afin de générer des siRNAs (Short-Intefering RNA) (ONODERA *et al.* 2005; PONTES *et al.* 2006; XIE *et al.* 2004). La protéine AGO4 (Argonaute 4) se lie alors de façon préférentielle à ces siRNA hétérochromatiques (CAO and JACOBSEN 2002; QI *et al.* 2006; ZILBERMAN *et al.* 2003). Les complexes siRNA/AGO4 interagissent ensuite avec les transcrits pol V et vont guider la méthylation *de novo* de l'ADN cible (AUFSATZ *et al.* 2002; HE *et al.* 2009; KANNO *et al.* 2005; PONTES *et al.* 2006; PONTIER *et al.* 2005; WIERZBICKI *et al.* 2008). La méthyltransférase DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2) est responsable de cette méthylation *de novo* des cytosines en contexte asymétrique (CAO and JACOBSEN 2002).

Les cibles de la voie RdDM dépendante de pol IV/pol V comprennent des séquences répétées comme les éléments transposables, mais aussi des régions régulatrices de gènes codant des protéines, l'ADNr 45S et l'ADNr 5S (MATZKE *et al.* 2007). En 2005, Onodera *et al.* ont montré que dans un mutant de la sous-unité commune à pol IV et pol V, les gènes d'ARNr 5S sont hypométhylés et la structure chromatinienne associée à ces gènes (dite « chromatine 5S ») est décompactée (ONODERA *et al.* 2005). De plus, pol IV colocalise physiquement avec l'ADNr 5S et l'ADNr 45S (PONTES *et al.* 2006). L'équipe a donc décidé d'étudier la piste d'une régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S impliquant la voie RdDM. Pour cela, l'expression d'ARNr 5S atypiques, le niveau de compaction de la chromatine d'ADNr 5S ainsi que les profils de méthylation des gènes 5S dans différents mutants de cette voie ont été étudiés (DOUET *et al.* 2009).

Un transcrit atypique 5S, composé de la région transcrite et de 90 pb de la séquence intergénique, est faiblement exprimé dans des plantes sauvages (VAILLANT *et al.* 2006). Ce transcrit de 210 nucléotides, plus long donc que les 120 nucléotides d'un ARNr 5S classique, est nommé 5S-210. Tout comme les transcrits 5S classiques de 120 nucléotides, dans une

plante sauvage, les transcrits 5S-210 ne présentent aucune mutation au sein de leur séquence transcrite. Les 5S-210 retrouvés dans une plante sauvage sont issus d'unités majoritaires. La transcription de cet ARN 5S-210 est fortement augmentée dans des mutants de méthylation, *met1* et *ddm1*, par rapport à une plante sauvage (VAILLANT *et al.* 2006). Il est donc considéré comme un marqueur de la levée du « silencing » transcriptionnel des gènes d'ARNr 5S. De plus, il s'avère être le précurseur de siRNA 5S impliqués dans la voie RdDM et notamment du siRNA 1003 qui cible les séquences intergéniques de l'ADNr 5S (BLEVINS *et al.* 2009; XIE *et al.* 2004). L'expression de ce transcrit 5S-210 a été étudiée lors des travaux de Julien Douet concernant le lien entre pol IV/pol V et les gènes d'ARNr 5S.

L'ensemble des acteurs de la voie RdDM a un rôle dans le contrôle qualitatif de l'expression de ces gènes (DOUET *et al.* 2009). En effet, les 5S-210 retrouvés dans des mutants de cette voie présentent une ou plusieurs mutations au niveau de leur séquence transcrite par rapport à ceux d'une plante sauvage sans que leur taux soit augmenté. Il y a donc expression, dans des mutants de la voie RdDM, d'ARNr 5S-210 issus d'unités minoritaires. La voie RdDM est donc impliquée dans la répression des gènes d'ARNr 5S minoritaires. Cependant dans ces mutants, bien qu'il y'ait diminution de la méthylation de motifs asymétriques, aucune décompaction de la « chromatine 5S » n'est observée. Par contre, de façon surprenante, les différents mutants des sous-unités spécifiques de l'ARN pol V présentent une accumulation du 5S-210 plus importante que celle d'une plante sauvage ou des autres mutants de la voie RdDM. Autre fait notable, les transcrits 5S-210 qui s'accumulent dans les mutants *pol V* ne proviennent que du bloc 5S du chromosome 4. En effet, l'origine du transcrit 5S-210 peut être déterminée puisque contrairement aux ARNr 5S de 120 nucléotides, il contient le stretch de T, signature des différents loci d'ADNr 5S (Cf. III.3.3). Toutefois, dans ces mutants, le locus 5S du chromosome 4 ne présente pas de déméthylation asymétrique supplémentaire par rapport au chromosome 5. Mais, alors qu'aucune décompaction de la « chromatine 5S » du chromosome 5 n'est observée, une décompaction de l'ADNr 5S du chromosome 4 concomitante avec celle des gènes 45S a lieu.

En conclusion, les gènes d'ARNr 5S sont contrôlés d'un point de vue qualitatif par l'ensemble de la voie RdDM, puisque dans des mutants de cette voie, il y'a expression de 5S-210 minoritaires. Elle réprime donc l'expression des unités 5S minoritaires de tous les loci. Mais dans cette régulation des gènes d'ARNr 5S, l'ARN pol V joue un rôle additionnel

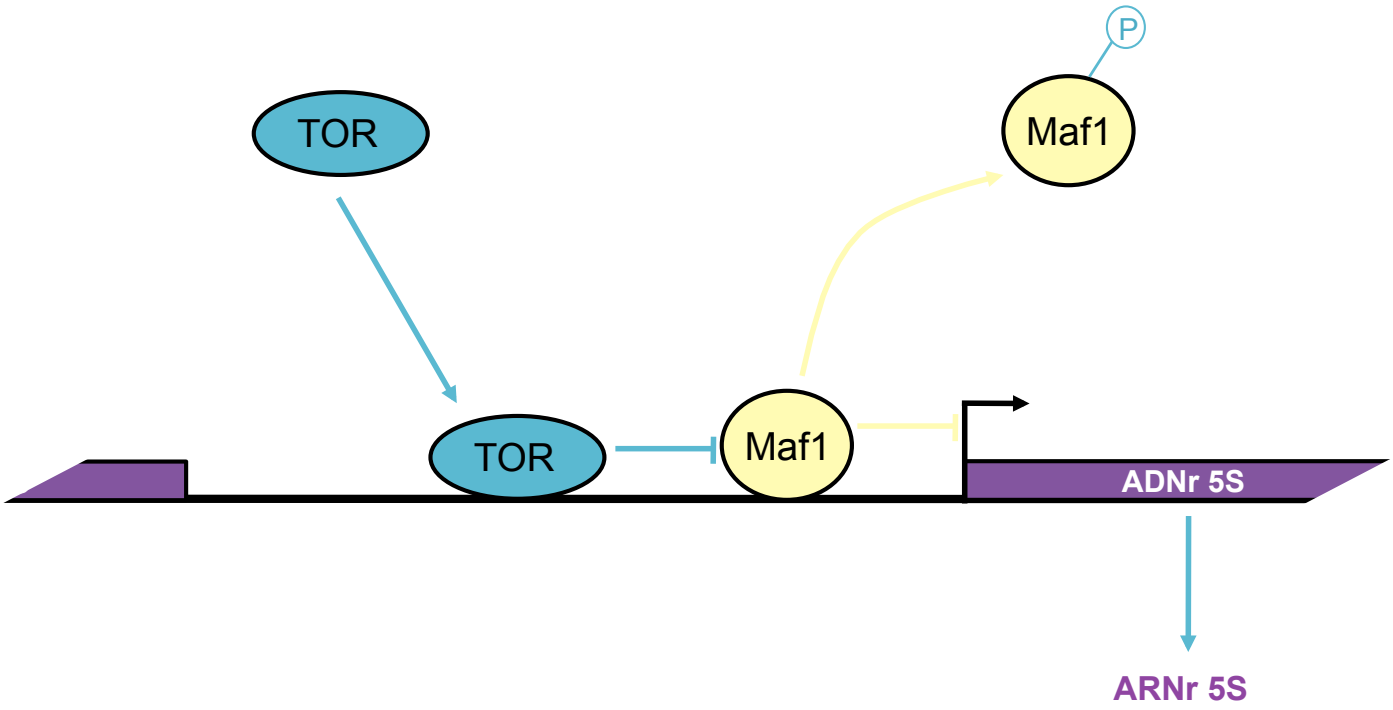


Figure 12 : Représentation schématique de la voie de régulation TOR.
La protéi` e Maf1 se lie à l'ADNr 5S et empêche so` expressio` . Lorsque la protéi` e TOR se fixe au ` iveau de l'ADNr 5S, elle phosphoryle Maf1 permetta` t ai` si l'expressio` des gè` es d'ARNr 5S.

spécifique du chromosome 4, indépendamment de l'ARN pol IV et de la voie RdDM. Sur le chromosome 4 se trouve également le NOR4 (Nucleolar Organizing Region), c'est-à-dire des gènes 45S. La proximité des gènes 5S avec ce NOR, lui-même régulé par l'ARN pol V (DOUET *et al.* 2009), pourrait expliquer le ciblage spécifique par l'ARN pol V des gènes d'ARNr 5S de ce chromosome et la possibilité pour la plante de déréprimer de façon coordonnée les gènes d'ARNr 5S et 45S.

IV.5. La voie TOR participe au contrôle de l'expression des gènes d'ARNr 5S

La voie de régulation TOR (Target Of Rapamycin) régule de nombreux processus biologiques, notamment la transcription et la traduction des composants du ribosome (MARTIN *et al.* 2006; MAYER and GRUMMT 2006). Les protéines TOR, qui sont des kinases, sont même considérées comme les contrôleurs centraux de la croissance cellulaire puisqu'elles la favorisent lorsque les conditions sont avantageuses. Cette voie permet le couplage de la biogénèse des ribosomes avec la disponibilité en nutriments. Il a été démontré, chez *S.cerevisiae*, que dans des cellules traitées à la rapamicyne (qui mime l'effet de carences en nutriments sur TOR), il se met en place une répression de l'initiation de la transcription pol III au niveau des gènes d'ARNr 5S (ZARAGOZA *et al.* 1998). Des études similaires sur des cellules de mammifères montrent que l'inhibition de la voie TOR diminue la transcription pol III. Cette répression serait due à une association plus faible du complexe de transcription pol III au niveau des gènes d'ARNr 5S (WHITE 2005). Chez la levure, grâce à des expériences de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation), il a pu être démontré que la protéine TOR interagit directement avec l'ADNr 5S (WEI *et al.* 2009). Cette interaction entre TOR et l'ADNr 5S est indispensable pour que TOR puisse réguler la phosphorylation de Maf1, inhibiteur de la transcription de type pol III, qui se lie, notamment, à l'ADNr 5S (KANTIDAKIS *et al.* 2010; PLUTA *et al.* 2001; REINA *et al.* 2006). En effet, en conditions favorables, TOR se lie à l'ADNr 5S et va alors phosphoryler la protéine Maf1 qui ne pourra plus inhiber la transcription de ces gènes (WEI *et al.* 2009) (Figure 12).

Chez *Arabidopsis thaliana*, TOR tient également un rôle central dans la croissance cellulaire. Il a, en effet, été démontré que la croissance, la résistance à des stress ainsi que l'accumulation de polysomes étaient positivement corrélées aux taux d'ARNm de AtTOR

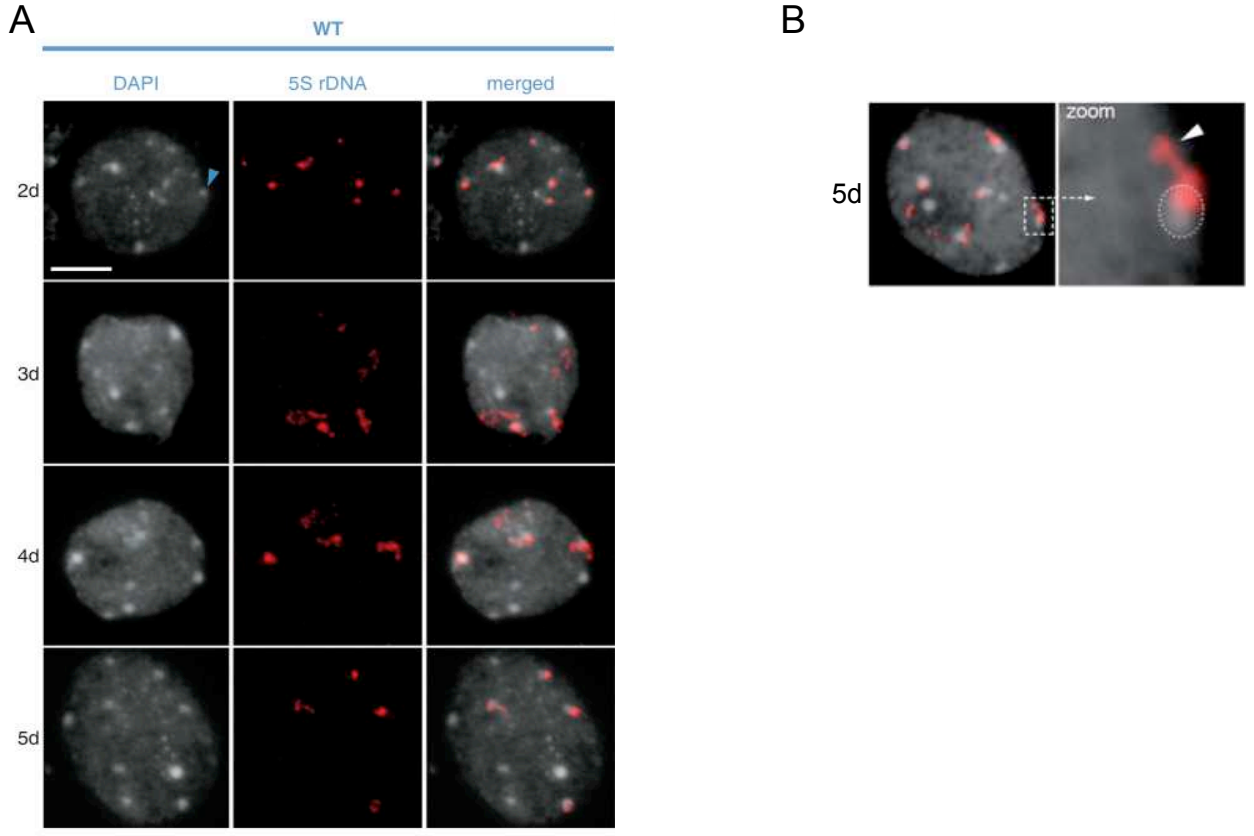


Figure 13 : Organisation de la chromatine d'ADNr 5S dans les premiers jours du développement chez Arabidopsis.

A. Des noyaux de cotylédons de 2 à 5 jours post-germination (2d-5d) ont été colorés au DAPI (colonne de gauche) puis hybridés avec une sonde 5S (colonne du milieu). La flèche bleue montre un pré-chromocentre. Fortement compacté à 2 jours, l'ADNr 5S est décompacté à 3 jours et se réorganise à 4 jours.

B. Dès 5 jours, l'ADNr 5S acquiert une organisation mature. Une partie de la chromatine d'ADNr 5S est hétérochromatique et une autre partie, sous forme de boucle, est euchromatique. La flèche blanche montre une boucle d'ADNr 5S.

(D'après Douet *et al*., 2008)

(DEPROST *et al.* 2007). La fixation de TOR sur l'ADNr 5S et son implication directe dans le contrôle de ces gènes n'ont pourtant pas encore été démontrées. Toutefois, le fait que TOR soit capable de se lier à l'ADNr 45S chez Arabidopsis (REN *et al.* 2011) et qu'elle soit hautement conservée, laisse supposer que, d'une façon similaire à celle observée chez la levure ou les mammifères, l'expression des gènes d'ARNr 5S, chez Arabidopsis, est contrôlée par TOR.

V. Remodelage de la chromatine d'ADNr 5S dans les premiers jours du développement

Chez *Arabidopsis thaliana*, les premiers résultats laissant supposer que la chromatine d'ADNr 5S subissait une réorganisation nécessaire à l'obtention d'une structure d'ADNr 5S mature ont été obtenus dans l'équipe. En effet, il a été montré qu'à deux jours après germination, l'hétérochromatine des noyaux de cotylédons, premiers tissus chlorophylliens à émerger après la germination, se présente sous forme de pré-chromocentres plus petits que les chromocentres (structures hétérochromatiques du noyau) d'une feuille d'une plante adulte de 3 semaines (Figure 13). L'ADNr 5S colocalise parfaitement avec ces pré-chromocentres, alors que dans une feuille d'une plante de 3 semaines l'ADNr 5S présente une organisation particulière. En effet, seule une partie de l'ADNr 5S colocalise toujours avec l'hétérochromatine, l'autre partie formant des boucles euchromatiques (MATHIEU *et al.* 2003a). Notre équipe s'est donc intéressée d'un peu plus près à cette réorganisation dans les tous premiers jours suivant la germination.

Étonnamment, des expériences de FISH ont montré que l'ADNr 5S subissait une très forte décompaction à 3 jours, suivie d'une recondensation de cette chromatine afin d'obtenir à 5 jours post-germination, la structure chromatinienne de l'ADNr 5S d'une feuille adulte (DOUET *et al.* 2008) (Figure 13). Cette réorganisation est accompagnée de changements des profils de méthylation. Entre 2 et 5 jours post-germination, une diminution de la méthylation asymétrique est observée alors qu'une faible augmentation de la méthylation symétrique a lieu. Ces changements de méthylation dans une plante sauvage sont contrôlés par deux protéines : ROS 1 (Repressor of Silencing 1) et la voie RdDM. En effet, dans un mutant *ros1*, la déméthylation asymétrique ainsi que l'étape de

décompaction à 3 jours n'ont plus lieu. Quatre jours après la germination, dans un mutant *nrpd2a* (sous-unité commune aux ARN pol IV et V) contrairement à une plante en contexte sauvage, la recondensation n'a pas lieu, la « chromatine 5S » reste fortement décompactée. ROS1 intervient donc lors de la décompaction de la chromatine d'ADNr 5S et la voie RdDM, ou plus spécifiquement une des deux polymérases, est essentielle pour sa recondensation (DOUET *et al.* 2008). Cette réorganisation post-germination de la chromatine n'est pas seulement observée au niveau de la chromatine d'ADNr 5S puisque des expériences de FISH, réalisées avec une sonde 25S, ont également mis en évidence une réorganisation de la chromatine d'ADNr 45S qui code le précurseur des trois autres ARN ribosomiques indispensables à la formation du ribosome (PONTVIANNE *et al.* 2010).

Les résultats obtenus par Julien Douet montrent donc qu'un remodelage de la chromatine d'ADNr 5S, dans les premiers jours du développement, est nécessaire afin de permettre la mise en place d'une structure chromatinienne mature, identique à celle d'une plante adulte, et de permettre la transcription optimale des gènes d'ARNr 5S. Au vu des observations sur l'ADNr 45S, cet événement de réorganisation de la chromatine dans les premiers jours du développement semble être nécessaire pour l'ensemble des gènes d'ARN ribosomiques.

Un phénomène de réorganisation de l'hétérochromatine a également été mis en évidence lors de la dédifférenciation de cellules du mésophylle en protoplastes, chez *Arabidopsis thaliana* (TESSADORI *et al.* 2007a). Une réduction de la taille et du nombre de chromocentres a été observée attestant d'une diminution sévère de la fraction hétérochromatique dans ces protoplastes. Cette diminution de l'hétérochromatine engendre une forte décompaction de l'ADNr 5S et des répétitions centromériques 180 pb alors que seule une fraction de l'ADNr 45S est décondensée. Lorsque ces protoplastes sont laissés en culture, l'hétérochromatine se remet en place progressivement et séquentiellement, l'ADNr 45S, les répétitions de 180 pb puis l'ADNr 5S se recompactent.

Chez les mammifères, plusieurs publications avaient déjà démontré une corrélation entre la formation de l'hétérochromatine péricentromérique et la différenciation cellulaire dans le développement précoce (CAMMAS *et al.* 2002; PROBST *et al.* 2007; PUSCHENDORF *et al.* 2008; RANGASAMY *et al.* 2003). Par exemple, lors de la fécondation, les génomes haploïdes mâle et femelle se trouvent réunis au sein d'une même cellule mais présentent une

organisation chromatinienne très différente. Effectivement, le génome mâle est fortement compacté comparé à celui du gamète femelle qui est proche de celui d'une cellule somatique. Les deux génomes vont alors subir une restructuration afin d'obtenir des centromères fonctionnels et ce dès le stade 2 cellules (PROBST *et al.* 2007).

Chapitre 2 : Le facteur de transcription TFIIIA

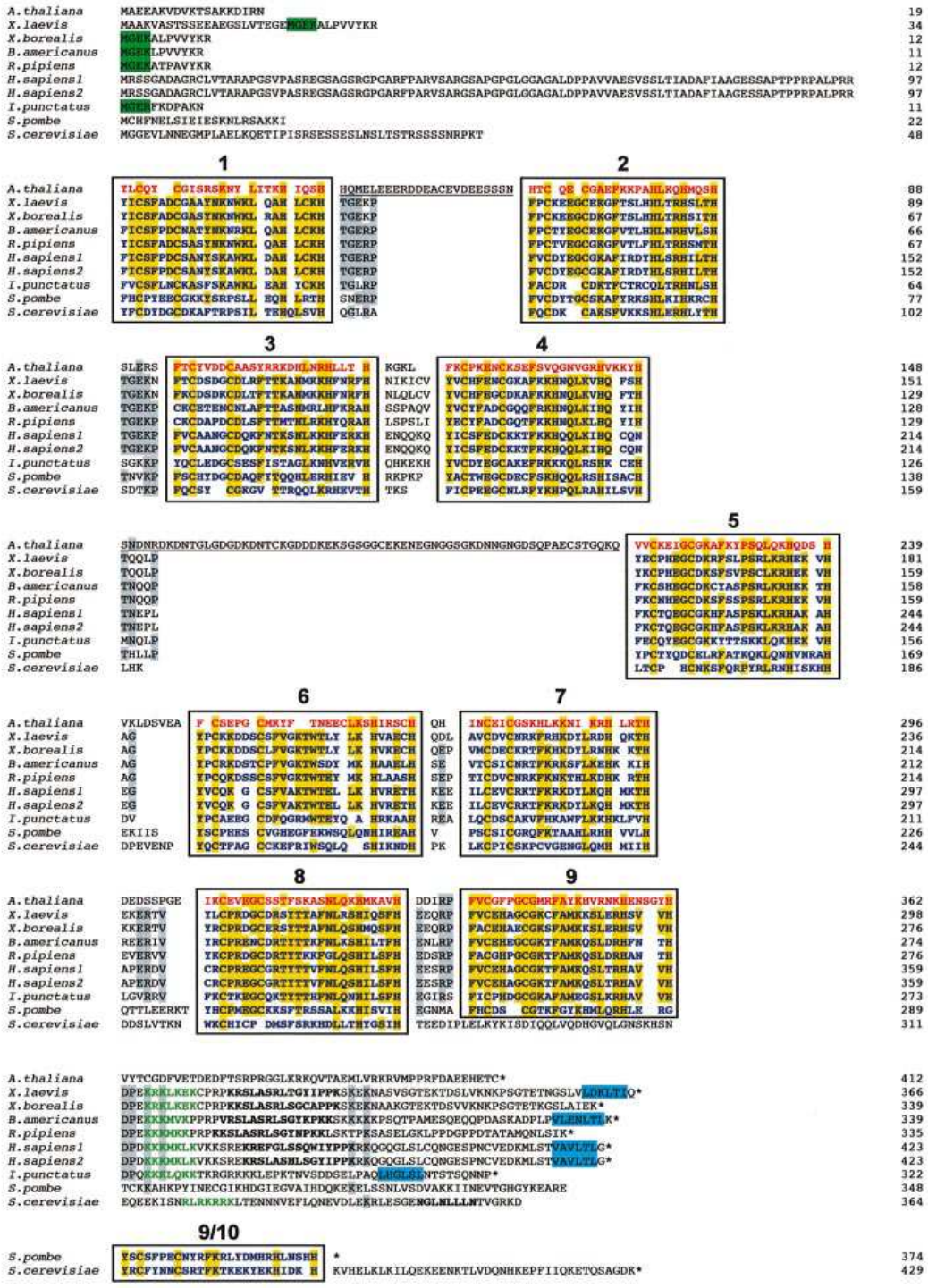


Figure 14 : Alignement des séquences primaires de TFIIIA de différentes espèces.

Les doigts de zinc sont encadrés en noir. Les doigts de zinc d'Arabidopsis sont écrits en rouge, ceux des autres espèces en bleu. Les séquences d'Arabidopsis non alignées sont soulignées. Les résidus conservés dans 50% des séquences sont surlignés en gris ou en jaune dans les doigts de zinc. Le motif NLS est écrit en vert, le motif TAS en gras. Le motif MGEK/R et NES sont surlignés en vert et bleu, respectivement. Le nombre de résidus total est écrit à droite. Les astérisques indiquent la fin de la séquence. (Daprès Mathieu *et al.*, 2003)

Comme il a été mentionné précédemment (Cf. chapitre 5S IV.1.), alors que TFIIIC et TFIIIB sont considérés comme les facteurs généraux de la transcription de type ARN polymérase III, le facteur de transcription TFIIIA est, lui, spécifique des gènes d'ARNr 5S. Son rôle principal est de programmer la transcription des gènes 5S en se liant directement à l'ICR ce qui a pour conséquence de recruter la machinerie transcriptionnelle pol III. Sa spécificité de reconnaissance du promoteur interne de ces gènes en fait donc un des premiers facteurs limitants de l'expression des gènes d'ARNr 5S.

Le facteur de transcription IIIA fait partie de la famille des « zinc-finger proteins », il est considéré comme l'archétype d'une protéine à doigts de zinc. En effet, TFIIIA a été la première protéine à doigts de zinc isolée mais également le premier facteur de transcription eucaryote à avoir été purifié. Chez le xénope, chaque doigt de zinc, de type Cys_2His_2, consiste en environ 30 acides aminés qui connectent les quatre résidus, deux cystéines et deux histidines invariables, qui permettent le recrutement d'un ion zinc et la formation de la structure globulaire propre à un doigt de zinc (MILLER *et al.* 1985). Ce sont ces motifs doigts de zinc qui sont responsables des interactions de TFIIIA avec des protéines, telles que TFIIIC, avec l'ADN au niveau de l'ICR des gènes 5S et avec l'ARNr 5S. La protéine a été isolée pour la première fois, chez le xénope, en 1980 à partir d'extraits d'ovocytes où la protéine est fortement abondante (ENGELKE *et al.* 1980; PELHAM and BROWN 1980; PELHAM *et al.* 1981), le gène a, quant à lui, été identifié et cloné par Ginsberg *et al.*, en 1984, toujours à partir d'ovocytes de xénope (GINSBERG *et al.* 1984). La protéine a ensuite été caractérisée dans cet organisme ainsi que chez *Saccharomyces cerevisiae*.

I. Divergences inter-espèces

Bien que TFIIIA conserve le même rôle principal d'initiation de la transcription des gènes 5S dans l'ensemble des organismes étudiés, l'analyse des séquences protéiques de TFIIIA de plusieurs espèces comme *X.laevis* (GINSBERG *et al.* 1984), l'homme (DREW *et al.* 1995), la souris et le rat (HANAS *et al.* 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (ARCHAMBAULT *et al.* 1992), *Schizosaccharomyces pombe* (SCHULMAN and SETZER 2002)et *Arabidopsis thaliana* (MATHIEU *et al.* 2003b), a révélé une faible conservation de la séquence primaire de la protéine en dehors des motifs doigts de zinc (Figure 14). Par exemple, la protéine TFIIIA de levure n'est que 20% identique à celle du xénope (ARCHAMBAULT *et al.* 1992) et la protéine

TFIIIA d'*Arabidopsis* et celle de *S.cerevisiae* ne sont identiques qu'à 17% (MATHIEU *et al.* 2003b). Cependant, malgré ces divergences de séquence primaire, les protéines TFIIIA identifiées présentent une organisation globale similaire à celle observée chez *X.laevis*. En effet, elles possèdent toutes neuf doigts de zinc consécutifs de type Cys_2His_2, à l'exception des levures et d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 14). Chez *S.cerevisiae*, les doigts de zinc 8 et 9 sont séparés par un espaceur long de 81 acides aminés (ARCHAMBAULT *et al.* 1992) et *S.pombe* contient un dixième doigt de zinc (SCHULMAN and SETZER 2002). De même chez *Arabidopsis thaliana*, les doigts de zinc 4 et 5 sont séparés par 66 acides aminés (MATHIEU *et al.* 2003b).

Différents motifs caractéristiques de protéines nucléaires et de facteurs de transcription sont retrouvés au sein de la séquence de TFIIIA (Figure 14). Là encore, des différences existent selon les espèces étudiées, tous les signaux n'étant pas obligatoirement conservés d'un organisme à l'autre. Des motifs NES (Nuclear export signal) sont retrouvés chez le poisson-chat, l'homme, *X.leavis* et *B.americanus* (FRIDELL *et al.* 1996; HANAS *et al.* 2002; OGILVIE and HANAS 1997), des NLS (Nuclear localization signal) sont présents dans plusieurs espèces d'amphibiens et chez l'homme (FRIDELL *et al.* 1996; HANAS *et al.* 2002; OGILVIE and HANAS 1997). Des domaines d'activation de la transcription (TAS) ont également été identifiés chez l'homme, les crapauds (MAO and DARBY 1993; OGILVIE and HANAS 1997; VRANA *et al.* 1988). L'ensemble de ces motifs se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine TFIIIA, après les doigts de zinc. Alors que *S.pombe* ne possède aucun de ces motifs (SCHULMAN and SETZER 2002), *S.cerevesiae* présente un NLS et un TAS après son neuvième doigt de zinc. Aucun de ces signaux n'est retrouvé chez *Arabidopsis thaliana* (MATHIEU *et al.* 2003b).

II. TFIIIA chez *Xenopus laevis*

II.1. Le gène TFIIIA de *Xenopus laevis*

L'expression du gène TFIIIA est sous le contrôle de trois éléments positifs et potentiellement d'un élément négatif (ce dernier n'ayant pas été confirmé) situés dans la région en amont du site d'initiation de la transcription : l'élément E1 en -269, l'élément E2 en -236 et l'élément E3 en -669 (HALL and TAYLOR 1989; KAULEN *et al.* 1991; PFAFF *et al.* 1991;

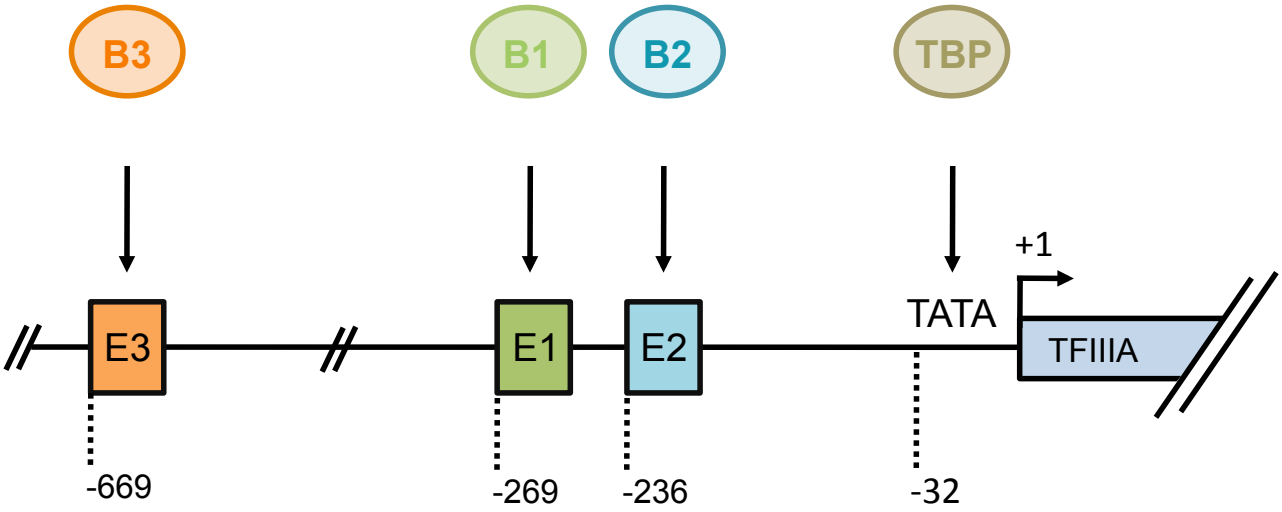


Figure 15 : Représentation schématique du gène TFIIIA et de ses séquences régulatrices chez *Xenopus laevis*.
Le gène TFIIIA chez le xénope est sous le contrôle de quatre éléments: les éléments E1, E2, E3 et une boîte TATA. Ces quatre séquences sont reconnues respectivement par B1 (USF), B2 (Sp1), B3 (Vg1 RBP/VERA) et une TBP.

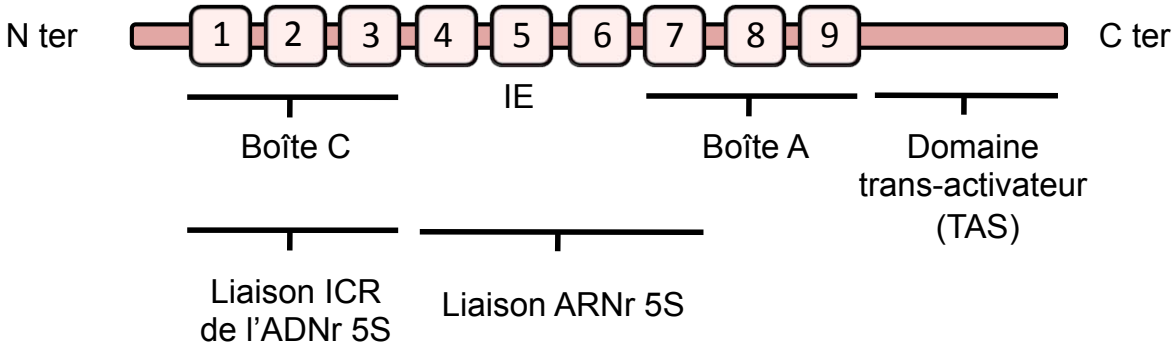
SCOTTO *et al.* 1989) (Figure 15). Les protéines fixant ces sites sont nommées B1, B2 et B3, respectivement (HALL and TAYLOR 1989; KAULEN *et al.* 1991; PFAFF *et al.* 1991; PFAFF and TAYLOR 1992; SCOTTO *et al.* 1989). B1 a été identifiée comme étant l'homologue de USF (Upstream Stimulatory Factor) chez *Xenopus laevis* (KAULEN *et al.* 1991) ; elle reconnaît au niveau de E1 une séquence palindromique de 6 nucléotides (5'CACGTG3') (SCOTTO *et al.* 1989). B2, quant à elle, correspond à la protéine Sp1, un facteur de transcription à boite GC/doigt de zinc (PENBERTHY *et al.* 2003). B3 qui se lie à l'élément E3, séquence de 8 nucléotides répétée 4 fois (PFAFF and TAYLOR 1992), est un membre de la famille des protéines à domaine KH (K-Homologs) plus précisément elle correspondrait à la protéine Vg1 RBP/VERA chez le xénope (GRIFFIN *et al.* 2003).

Des expériences réalisées à partir d'extraits d'ovocytes de xénope ont permis de mettre en évidence que les 306 pb en amont du site d'initiation de la transcription étaient suffisantes pour l'expression du gène (MATSUMOTO and KORN 1988; SCOTTO *et al.* 1989). En effet, il s'avère que l'élément E3, en -669, jouerait un rôle dans l'expression sélective de TFIIIA dans les ovocytes. Des expériences ont pu montrer que l'absence de l'élément E3 dans des ovocytes diminuait de plus de deux fois le taux d'accumulation des ARNm de TFIIIA. De plus, la protéine B3 n'est pas un facteur abondant dans toutes les cellules du xénope mais elle est fortement présente dans les ovocytes (PFAFF and TAYLOR 1992). La fonction de l'élément E3/B3 serait donc certainement d'augmenter la transcription du gène TFIIIA durant l'ovogénèse. Il est important de rappeler que les gènes d'ARNr 5S présentent une régulation développementale et qu'ils sont fortement exprimés pendant l'ovogénèse, cette forte accumulation d'ARNr 5S étant corrélée à celle de leur facteur de transcription TFIIIA (GINSBERG *et al.* 1984).

Chez *X.laevis*, le gène TFIIIA possède également en -32 une boite TATA qui serait liée par une TBP (TATA Binding Protein) (PFAFF and TAYLOR 1998; SCOTTO *et al.* 1989).

L'implication de la structure chromatinienne dans l'expression du gène TFIIIA chez le xénope a été mise en évidence par Pfaff *et al.* (PFAFF and TAYLOR 1998). Ils ont montré que des délétions modérées ou des insertions dans la séquence de 190 nucléotides séparant l'élément 2 de la boite TATA diminuaient de façon drastique la transcription de ce gène. Il semblerait que ce soit le positionnement d'un nucléosome au niveau de cette séquence qui influencerait la transcription de TFIIIA. Plus précisément, c'est la formation de complexes

Xenopus laevis



Saccharomyces cerevisiae

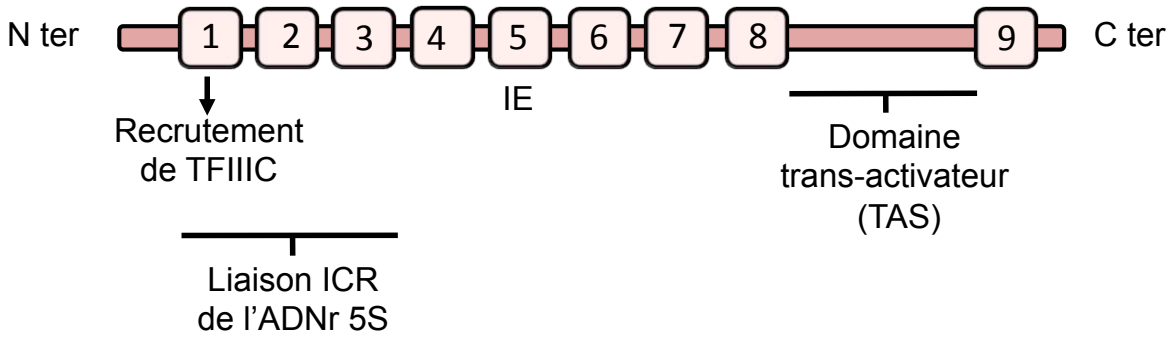


Figure 16 : Rôles des doigts de zinc de la protéine TFIIIA chez *Xenopus laevis* et *Saccharomyces cerevisiae*.
Les doigts de zinc sont numérotés et représentés par les carrés. Les fonctions les plus importantes des doigts de zinc ainsi que leurs liaisons principales sont indiquées en face de leur numéro mais chaque doigt de zinc de TFIIIA est impliqué dans l'ensemble des interactions. ICR = Internal Control Region. La partie N-terminale de la protéine se lie sur la partie 3' de l'ICR. Les protéines ne sont pas à l'échelle.

ADN/protéines au niveau des sites E1 et E2 qui permettrait le positionnement correct du nucléosome. En effet, lorsque les éléments E1 et E2 sont mutés et donc peu aptes à la fixation de B1 et B2, le positionnement du nucléosome en est affecté (PFAFF and TAYLOR 1998). De plus, il a déjà été démontré que USF (B1) et Sp1 (B2) étaient impliquées dans la formation de la chromatine active au niveau des promoteurs, autres que TFIIIIA, qu'ils régulent chez les mammifères ou le xénope (PERLMANN and WRANGE 1991; PONDEL *et al.* 1995).

L'expression du gène TFIIIA chez *X.laevis* est donc contrôlée par plusieurs éléments en cis et protéines régulatrices de la transcription qui influenceraient la structure de la chromatine au niveau de son promoteur.

II.2. La protéine TFIIIA de *Xenopus laevis*

Cette protéine de 38,5 kDa est composée de 9 doigts de zinc (MILLER *et al.* 1985). Des expériences de digestion à la Dnase I, chez *Xenopus*, ont démontré qu'une seule molécule de la protéine TFIIIA est alignée au niveau de l'ICR des gènes d'ARNr 5S selon l'organisation suivante : les doigts de la partie N-terminale interagissent avec l'extrémité 3' (boîte C) et les doigts C-terminaux se lient avec l'extrémité 5' (boîte A) du promoteur (VRANA *et al.* 1988) (Figure 16).

En plus de son rôle de reconnaissance du promoteur interne des gènes d'ARNr 5S et donc d'initiateur de la transcription de ces derniers, chez le xénope, TFIIIA assure également le transport et le stockage de l'ARNr 5S dans l'ovocyte, en liant directement l'ARN transcrit, formant ainsi le complexe 7S RNP (cf. Chapitre 5S II.3.1.). La multifonctionnalité de TFIIIA s'explique en partie par le haut degré de variabilité en nombre et en identité des acides aminés constituant les doigts de zinc, en dehors des quatre invariables que sont les deux cystéines et les deux histidines (MILLER *et al.* 1985).

De nombreuses études ont été menées avec des protéines tronquées présentant la délétion d'un ou plusieurs doigts de zinc ou portant des mutations de substitution, afin de déterminer l'implication des différents domaines de TFIIIA dans la liaison à l'ADNr 5S ou à l'ARNr 5S. Les résultats obtenus, *in vitro*, ont permis de caractériser deux domaines précis : la région contenant les doigts de zinc [4,5,6,7], constituant le domaine minimal de liaison à l'ARNr 5S et la région des doigts [1,2,3] qui est suffisante pour la liaison de TFIIIA au

promoteur interne, le doigt de zinc 3 étant essentiel (CLEMENS *et al.* 1993; DARBY and JOHO 1992; PIELER *et al.* 1987; THEUNISSEN *et al.* 1992) (Figure 16). La région des doigts [4,5,6,7] contribue à elle seule, à 95% de l'énergie de liaison à l'ARNr 5S (CLEMENS *et al.* 1993) tout comme la région [1,2,3] qui contribue de façon similaire à la liaison au promoteur interne (CLEMENS *et al.* 1992; HAYES and CLEMENS 1992; LIAO *et al.* 1992). Cependant, bien que chaque domaine ait un rôle plus spécifique dans l'une ou l'autre des interactions, l'ensemble des doigts de zinc de TFIIIA contribue aux différents types de liaison. En effet, les doigts [4,5,6,7] constituent le domaine minimal de liaison à l'ARNr 5S en créant plusieurs points d'interaction avec les boucles A, B et E et les hélices II et V (MCBRYANT *et al.* 1995; THEUNISSEN *et al.* 1998), mais les doigts [1,2,3] créent un contact supplémentaire au niveau de l'hélice IV et les doigts [8,9] interagissent avec l'hélice III (THEUNISSEN *et al.* 1992). Quant à la liaison à l'ADN sur l'ICR, les doigts [1,2,3] se fixent au niveau de la boîte C, le doigt de zinc 5 au niveau de l'élément intermédiaire (IE) et les doigts C-terminaux [7,8,9] se lient à la boîte A (HAYES and TULLIUS 1992). Des mutations des doigts de zinc 8 et 9 n'ont que peu altéré les efficacités de liaison à l'ADN ou à l'ARN. Leur rôle le plus important semble être qu'en se fixant au niveau de la boîte A de l'ICR, ils permettent un positionnement correct de la partie C-terminale qui ne se lie pas l'ADNr 5S (CLEMENS *et al.* 1993).

La partie C-terminale qui suit le neuvième et dernier doigt de zinc, quant à elle, ne lie ni l'ARNr 5S ni l'ADNr 5S (SANDS and BOGENHAGEN 1991) mais est nécessaire pour l'activation de la transcription. En effet, si la partie C-terminale est délétée, l'activité transcriptionnelle de TFIIIA est réduite de 80% (SMITH *et al.* 1984). Plus précisément, Mao *et al.* ont mis en évidence une séquence de 14 acides aminés indispensable à une activité transcriptionnelle optimale. De façon intéressante, si la distance entre le domaine de liaison à l'ADN, constitué des 9 doigts de zinc, et ce domaine trans-activateur est augmentée, l'activité transcriptionnelle est réduite de 5 fois (MAO and DARBY 1993). Ceci suggère donc que la distance entre le neuvième doigt de zinc et la séquence activatrice de la transcription (TAS) joue un rôle critique dans l'efficacité de TFIIIA. De plus, des expériences menées par Hayes *et al.* ont montré que cette partie C-terminale permet la stabilisation du complexe TFIIIC/TFIIIA/ADNr 5S par une liaison directe de cette partie avec le complexe TFIIIC (HAYES *et al.* 1989).

Chez *Xenopus laevis*, les neuf doigts de zinc de TFIIIA peuvent donc être répartis en trois domaines distincts. Bien que ces domaines possèdent une activité de liaison qui leur est spécifique, l'ensemble des doigts de zinc, ainsi que la partie C-terminale sont indispensables au bon fonctionnement de TFIIIA que ce soit dans son rôle d'initiateur de la transcription ou dans son rôle de transport et de stockage de l'ARNr 5S.

III. La protéine TFIIIA chez *Saccharomyces cerevisiae*

Bien que le xénope reste l'organisme dans lequel TFIIIA a été le plus étudié, un certain nombre de données a été accumulé chez *S.cerevisiae*. Wang *et al*. ont pour la première fois purifié deux polypeptides, un de 48 et un de 51 kDa, possédant une forte affinité pour le promoteur interne des gènes d'ARNr 5S (WANG and WEIL 1989). Par la suite, le gène TFC2 codant pour la protéine TFIIIA a été cloné (ARCHAMBAULT *et al.* 1992). La traduction *in vitro* du transcrit dérivant de TFC2 a permis la synthèse d'une protéine de 51 kDa ayant la capacité de lier les gènes d'ARNr 5S de levure et d'activer la transcription de ces derniers. La forme de 48 kDa, mise en évidence par Wang *et al*. (1989), pourrait donc dériver de la protéine TFIIIA de 51 kDa par protéolyse ou par des modifications post-traductionnelles (ARCHAMBAULT *et al.* 1992) mais aucune donnée supplémentaire concernant cette hypothèse n'est disponible.

Chez la levure, le promoteur interne des gènes d'ARNr 5S est beaucoup plus petit que celui du xénope ou des plantes, il n'est composé que des 14 nucléotides composant la boite C (CHALLICE and SEGALL 1989). Le facteur TFIIIA ne se lie donc pas en totalité avec l'ADNr 5S mais occupe tout de même 35 pb au niveau de la séquence transcrite (BRAUN *et al.* 1989). De la même manière que chez *Xenopus laevis*, les trois premiers doigts de zinc N-terminaux sont suffisants pour la liaison à l'ADNr 5S (MILNE and SEGALL 1993; ROTHFELS *et al.* 2007; ROWLAND and SEGALL 1996), ils sont également suffisants pour le recrutement de TFIIIC (MILNE and SEGALL 1993), le doigt 1 étant essentiel à ce recrutement (ROTHFELS *et al.* 2007) (Figure 16). En effet, *in vitro*, la présence de deux mutations dans le doigt de zinc 1 abroge dans sa totalité l'activité transcriptionnelle de TFIIIA, certainement dû à l'impossibilité pour TFIIIA de recruter TFIIIC (ROTHFELS *et al.* 2007). Il a été démontré qu'une protéine TFIIIA tronquée ne contenant que les doigts [1,2,3] lie l'ICR des gènes 5S avec une affinité comparable à celle

d'une protéine TFIIIA pleine longueur (MILNE and SEGALL 1993; ROWLAND and SEGALL 1996). De plus, si l'un de ces trois doigts de zinc est muté, l'affinité de liaison, *in vitro*, de TFIIIA pour l'ADNr 5S est diminuée de façon équivalente pour chacune des mutations mais seules les protéines mutées pour les doigts 2 et 3 donnent des cellules viables *in vivo*. En effet, la mutation du doigt de zinc 1 est létale (ROTHFELS *et al.* 2007). Toutefois, les doigts N-terminaux ne sont pas les seuls à interagir avec l'ADNr 5S, puisque les autres doigts de zinc créent des liaisons avec l'ADNr 5S qui, bien que faibles, permettent certainement le positionnement correct et l'ancrage de la région [1,2,3] au niveau de l'ICR, leurs mutations altérant de façon plus ou moins importante l'activité transcriptionnelle de TFIIIA (MILNE and SEGALL 1993).

La différence la plus notable entre la protéine TFIIIA du xénope et celle de la levure est la présence d'une région de 81 acides aminés qui sépare les doigts de zinc 8 et 9 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'avère que cette région joue un rôle fondamental dans l'activité transcriptionnelle de TFIIIA. En effet, lorsque ces 81 acides aminés sont délétés, même si TFIIIA est capable de se lier aux gènes 5S, le complexe TFIIIA/ADNr 5S est non fonctionnel (MILNE and SEGALL 1993). Plusieurs délétions de cette région ont donc été réalisées, elles ont permis de mettre en évidence une région de huit acides aminés dont l'absence entraine la perte d'activité transcriptionnelle de TFIIIA (ROWLAND and SEGALL 1998). Cette séquence est riche en leucine et asparagine (NGLNLLLN), des acides aminés hydrophobes. Les chaînes hydrophobes de ce type sont considérées comme un des éléments clés des interactions de type protéine/protéine (YOUNG *et al.* 1994). Cette région riche en leucine et en asparagine joue donc ici un rôle d'activateur de la transcription en stabilisant le complexe de transcription. Malgré son implication dans l'activité de TFIIIA, cette région n'établit aucun contact direct avec l'ADNr 5S ; les doigts de zinc C-terminaux [7,8,9] liés à l'ADNr 5S permettraient le positionnement correct de cette région. Puisque située entre les doigts 8 et 9, elle prendrait alors une forme de boucle permettant une interaction directe avec l'une des sous-unité du complexe TFIIIC (ROWLAND and SEGALL 1998).

IV. TFIIIA chez Arabidopsis thaliana

Dans le règne végétal, la protéine TFIIIA a été pour la première fois isolée biochimiquement chez le maïs (WYSZKO *et al.* 1997) et à partir des étamines de tulipe

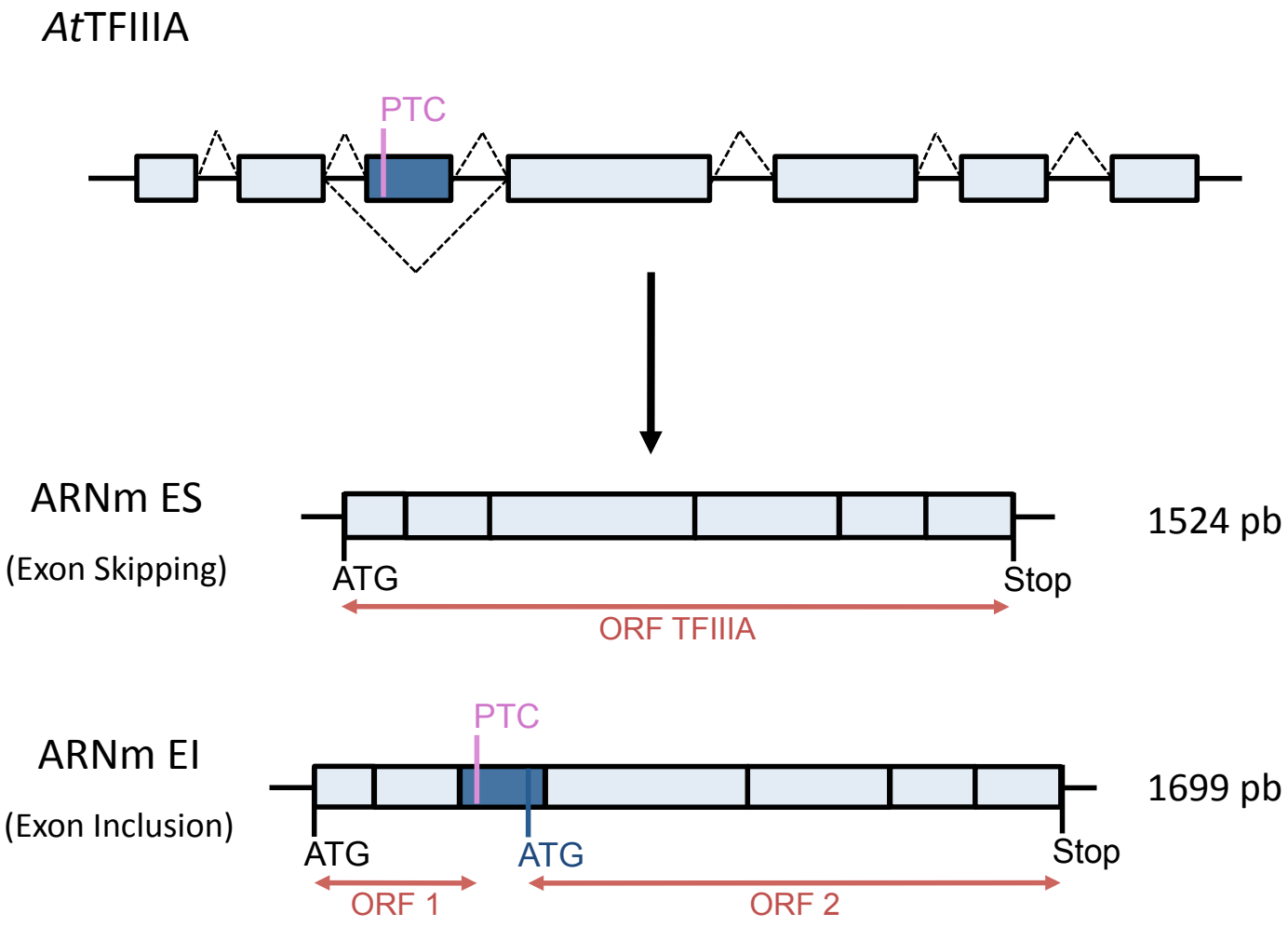


Figure 17 : L'ARN pré-messager *At*TFIIIA contient un exon alternatif.
Les exons sont représentés par les rectangles bleus, les introns par les traits noirs. L'exon alternatif en bleu foncé va être ou non épissé. S'il est exclu du transcrit, le transcrit obtenu est nommé ES (Exon Skipping). Le transcrit ES, une fois traduit, donne la protéine TFIIIA. Le transcrit EI (Exon Inclusion) est obtenu lorsque l'exon alternatif est maintenu. L'exon alternatif possède un codon stop prémature ou PTC, suivi d'un deuxième codon initiateur de la traduction. Le transcrit EI contient deux ORF putatives. Les tailles des transcrits sont indiquées à leur droite. (ORF= Open Reading Frame)

(WYSZKO and BARCISZEWSKA 1997). Dans ces deux plantes, la protéine TFIIIA identifiée conserve les mêmes caractéristiques fonctionnelles que chez le xénope, c'est-à-dire qu'elle est capable de lier aussi bien l'ADNr 5S que l'ARNr 5S et d'induire la transcription des gènes 5S *in vitro* (WYSZKO and BARCISZEWSKA 1997; WYSZKO *et al.* 1997). Le cDNA de TFIIIA quant à lui, a été cloné pour la première chez *Arabidopsis thaliana* (MATHIEU *et al.* 2003b). La traduction *in silico* de ce cDNA donne une protéine putative de 419 acides aminés et d'un poids théorique de 46 kDa. Grâce à une protéine recombinante GST-TFIIIA, les capacités de liaison de *At*TFIIIA à l'ADNr 5S et à l'ARNr 5S ont pu être démontrées *in vitro*. Cette protéine est également capable d'induire la transcription des gènes d'ARNr 5S dans des extraits cellulaires de tabac (MATHIEU *et al.* 2003b). Dans des protoplastes d'Arabidopsis, la protéine recombinante TFIIIA-GFP est localisée dans le noyau et plus particulièrement concentrée au niveau du nucléole. Cette étude a également montré, par des expériences de digestion à la DNase I, que *At*TFIIIA présentait le même profil de protection au niveau du promoteur interne d'un gène 5S que la protéine TFIIIA du xénope (MATHIEU *et al.* 2003b).

IV.1. Le gène TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène codant pour TFIIIA est localisé sur le chromosome 1 et n'est présent qu'en une seule copie. Il est composé de 7 exons et produit deux transcrits à la suite d'un épissage alternatif (Figure 17). En effet, le troisième exon va ou non être inclus dans l'ARNm (YOINE *et al.* 2006). Cet exon ainsi que l'épissage alternatif qu'il subit, est retrouvé dans l'ensemble du règne végétal comme *Oryza sativa*, *Lycopersicon esculentum* ou encore *Physcomitrella patens* mais absent chez les animaux (FU *et al.* 2009; HAMMOND *et al.* 2009). Le premier transcrit est produit par l'épissage de l'exon 3, il code pour la protéine TFIIIA pleine longueur, il est appelé ES (Exon Skipping). Le deuxième transcrit produit inclut le troisième exon, il est nommé EI (Exon inclusion). Dans une plante sauvage, les deux transcrits sont exprimés (YOINE *et al.* 2006) et des profils d'accumulation différents sont observés dans les quelques tissus étudiés (HAMMOND *et al.* 2009). Ce troisième exon, ou exon alternatif, a la particularité de posséder un codon stop considéré comme prémature suivi d'un codon ATG, initiateur de la traduction. Le transcrit EI contient donc deux ORF (Open Reading Frame) et coderait donc pour deux protéines putatives : la première contenant les deux premiers doigts de zinc de TFIIIA et la deuxième contenant les sept derniers.

IV.2. Régulation de l'expression de TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*

IV.2.1. Le transcrit EI n'est pas traduit

Les ARNm contenant un codon stop prémature PTC (premature translational termination codon) sont reconnus par une voie de dégradation des ARNm considérés comme aberrants, la voie NMD (Non-mediated mRNA Decay). Cette voie va empêcher la production de protéines tronquées potentiellement nocives pour la cellule en dégradant ces ARNm contenant un PTC (BAKER and PARKER 2004). Le transcrit EI du gène TFIIIA est donc une cible potentielle de cette voie. En effet, dans un mutant du gène codant pour UPF1, un des trois acteurs principaux de cette voie de régulation, le taux de transcrit EI est augmenté 17 fois par rapport à celui d'une plante sauvage (YOINE *et al.* 2006). De la même façon, des plantules d'Arabidopsis traitées à la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la voie NMD (BEELMAN and PARKER 1994), présentent une accumulation du transcrit EI plus importante que dans une plantule non traitée. Le ratio EI/ES augmente alors de 10 fois dans les plantules traitées par rapport à une plantule non traitée (FU *et al.* 2009).

Bien que l'ARNm EI soit une cible de la voie NMD, ces transcrits EI sont détectés dans une plante sauvage, il est donc envisageable que les transcrits non dégradés par cette voie soient traduits. La capacité de traduction du transcrit EI a donc été testée. Dans un premier temps des expériences de traduction *in vitro* ont montré que le transcrit EI était capable de produire une protéine correspondant à l'ORF 1 et à la taille d'une protéine TFIIIA ne contenant que les deux premiers doigts de zinc. Cependant, la protéine correspondant à l'ORF 2 n'a été détectée ni *in vitro*, ni *in vivo*. Aucune réinitiation de la traduction, au niveau du deuxième codon ATG de la forme EI, n'est donc possible (FU *et al.* 2009). Des construits contenant les ADNc ES ou EI, couplés à des tags, ont été exprimés de manière transitoire dans des feuilles de *Nicotiana benthamania*. Les analyses par western blot de ces tissus ont montré que seul le construit ES était capable de s'exprimer. De plus, les mêmes analyses menées avec une construction contenant l'ARN pré-messager de TFIIIA, qui donne les deux types de transcrits, n'ont révélé que la forme TFIIIA pleine longueur découlant de ES (HAMMOND *et al.* 2009). Le transcrit EI est donc non productif, il n'est pas traduit.

ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana*

Exon « 5S-like » du gène TFIIIA

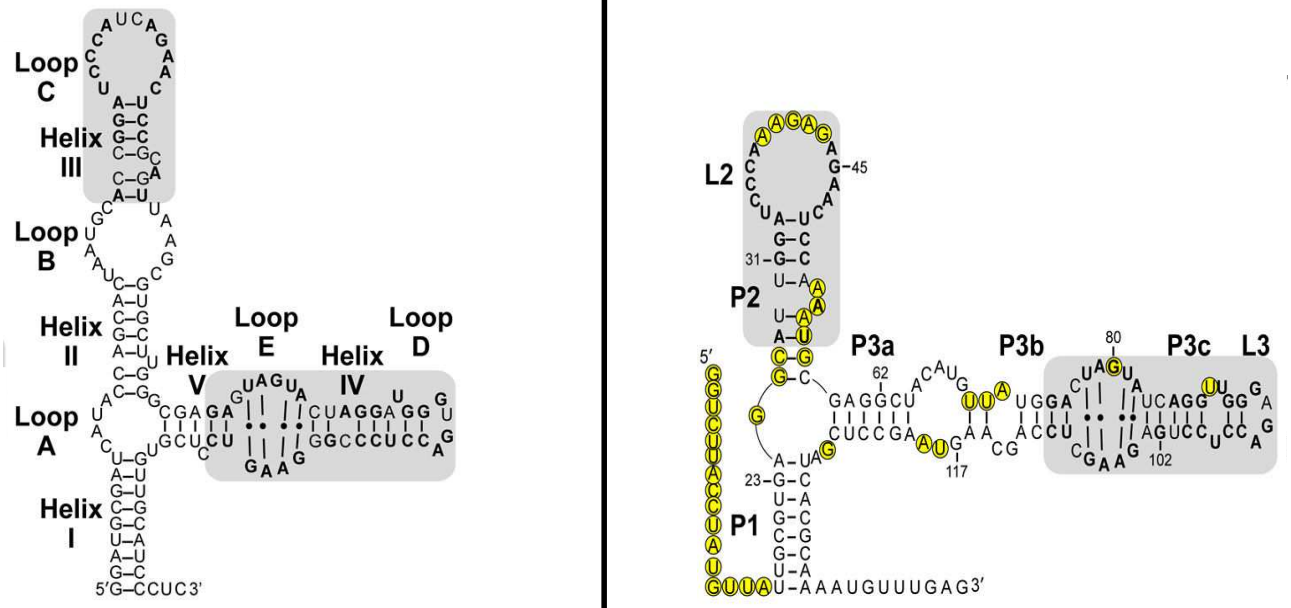


Figure 18 : Comparaison de la structure secondaire de l'ARNr 5S et de l'exon alternatif « 5S-like » du gène TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*.

L'exon alternatif « 5S-like » du gène TFIIIA présente de fortes homologies de séquences et de structure secondaire avec l'ARNr 5S. Les régions conservées entre l'ARNr 5S et l'exon « 5S-like » sont surlignés en gris, les résidus identiques sont en gras. Les boucles C, D et E ainsi que les hélices III et IV de l'ARNr 5S sont conservés dans l'exon « 5S-like ».

(D'après Hammond *et al.*, 2009)

IV.2.2. Régulation de l'épissage alternatif

Bien qu'il ne soit pas traduit, le transcrit EI joue un rôle important dans la régulation de l'expression du gène TFIIIA. Il s'avère que l'exon alternatif présente de fortes homologies de séquence et par conséquent de structure secondaire avec l'ARNr 5S (Figure 18). Il proviendrait de l'exonisation d'une molécule d'ARNr 5S dans un intron du gène TFIIIA. En effet, en plus de la structure en Y caractéristique de cet ARN, l'exon alternatif contient des structures « signatures » de l'ARNr 5S, telles que : les hélices III et IV et les boucles C, D et E (FU *et al.* 2009; HAMMOND *et al.* 2009). Théoriquement, cet exon « 5S-like » est donc capable de lier la protéine ribosomale L5 au niveau de l'hélice III et de la boucle D. La liaison avec la protéine TFIIIA, bien que suggérée par Fu *et al.* (2009), est quant à elle moins probable. En effet, même si les hélices III, IV et la boucle E interagissent avec TFIIIA, les boucles et les hélices de l'ARNr 5S les plus importantes pour cette liaison sont absentes (hélices II et V, boucles A et B). La surexpression de l'ADNc de TFIIIA chez Arabidopsis, entraînant probablement une augmentation des quantités d'ARNr 5S, résulte en une augmentation des proportions de la forme EI (FU *et al.* 2009). Ceci laisse supposer qu'une augmentation de TFIIIA favoriserait l'épissage alternatif vers le transcrit non-productif qui sera ensuite dégradé impliquant alors une diminution des taux protéiques de TFIIIA.

Fu et *al.* proposent donc un modèle simple selon lequel la protéine TFIIIA reconnaîtrait et fixerait l'exon « 5S-like » ce qui affecterait l'épissage alternatif en entrant, par exemple, en compétition avec un facteur d'épissage en occupant les sites d'épissage (FU *et al.* 2009). Ce modèle induit l'hypothèse suivante : quand les taux de TFIIIA sont faibles, l'exon « 5S-like » est épissé et la forme ES est produite, ce qui entraînerait l'augmentation des taux de protéine TFIIIA dans la cellule et donc celles des quantités d'ARNr 5S ; à l'inverse, lorsque les taux de TFIIIA sont élevés et par conséquent les taux d'ARNr 5S également, TFIIIA pourrait se fixer sur l'exon « 5S-like » empêchant ainsi son épissage, la forme EI serait alors produite puis dégradée par la voie NMD (FU *et al.* 2009). Cependant, Hammond *et al.* ont montré que la protéine TFIIIA ne se fixait pas au niveau de l'exon « 5S-like » (HAMMOND *et al.* 2009). De plus, ils ont mis en évidence que la protéine ribosomale L5, connue pour lier l'ARNr 5S chez Arabidopsis (MATHIEU *et al.* 2003b) et le transporter jusqu'au nucléole, était capable de lier l'exon « 5S-like » au niveau de son domaine hélice III. Par des expériences

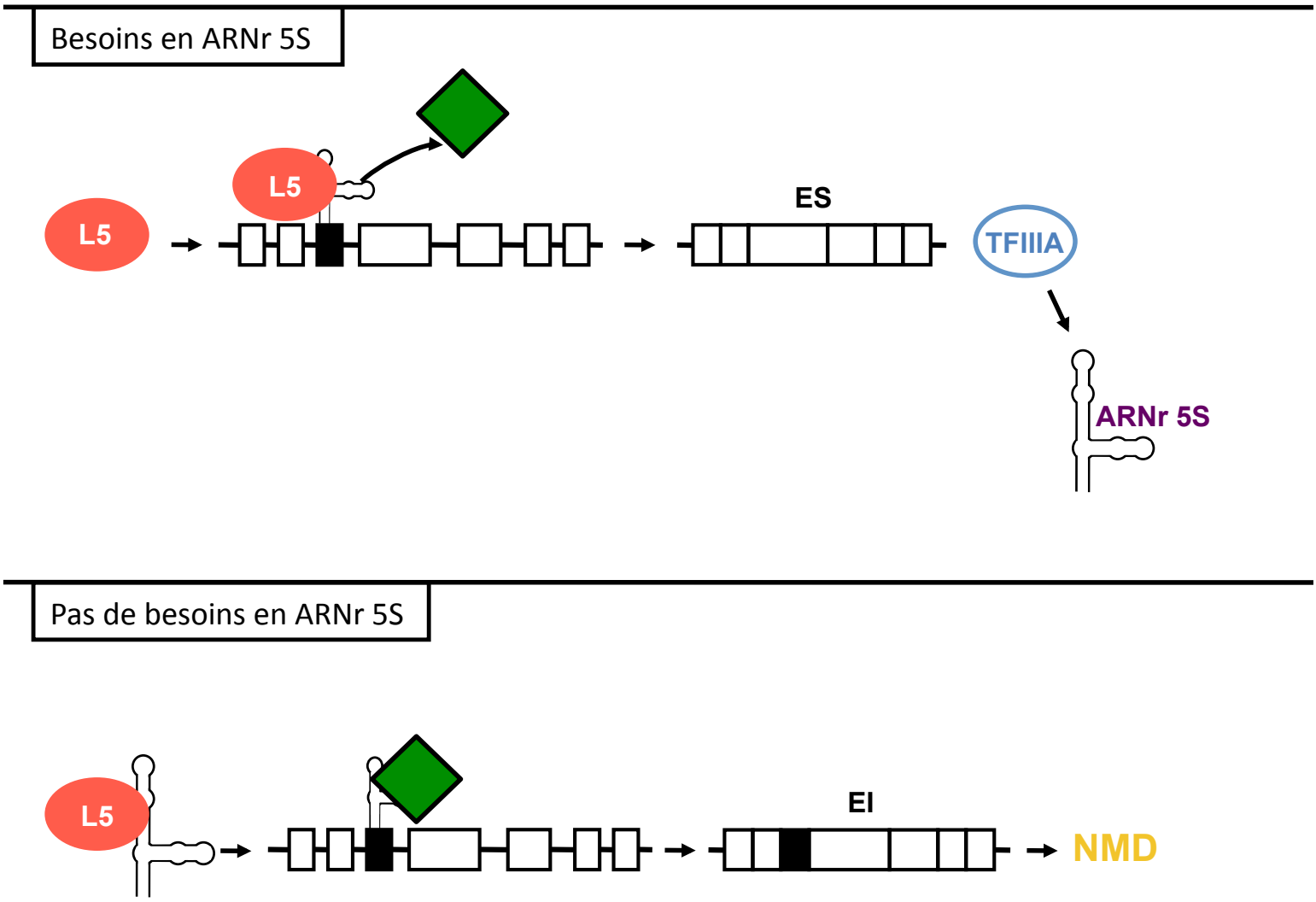


Figure 19 : Régulation de l'épissage alternatif du pré-messager TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*.
L'exon « 5S-like » est en noir. Les facteurs d'épissage sont représentés par le losange vert. Lorsque les quantités d'ARNr 5S sont faibles dans la cellule, L5 est libre et peut se fixer sur l'exon « 5S-like ». Sa fixation déplace des facteurs empêchant l'épissage, la forme ES est produite puis traduite en protéine TFIIIA. Lorsque les quantités d'ARNr 5S sont élevées, L5 est complexée à l'ARNr 5S, les facteurs empêchant l'épissage restent au niveau de l'exon « 5S-like », le transcrit EI est produit, puis dégradé par la voie NMD.
(D'après Hammond *et al.*, 2009)

impliquant des gènes rapporteurs *in vivo* chez *N. benthamania*, ils ont pu démontrer que la protéine L5 était directement responsable de l'épissage alternatif du gène TFIIIA (HAMMOND *et al.* 2009).

Ces résultats ont donc permis d'établir un modèle de régulation de l'épissage alternatif de l'ARN prémessager de TFIIIA reposant sur une auto-régulation négative de TFIIIA (Figure 19). Lorsque les taux d'ARNr 5S dans la cellule sont élevés, les taux de L5 libres sont plutôt faibles, dans ce cas, la protéine L5 est moins apte à lier l'exon « 5S-like » ; l'exon est donc inclus, et le transcrit EI est produit, il sera ensuite dégradé par la voie NMD. Si, dans le cas contraire, les taux d'ARNr 5S dans la cellule sont faibles, les taux de L5 libres sont élevés, L5 va alors se lier à l'exon « 5S-like » et va favoriser la machinerie d'épissage en faveur de la forme ES. Le transcrit ES est ensuite traduit en protéine TFIIIA et les ARNr 5S produits. Les auteurs supposent que L5, en se fixant, déplacerait un facteur empêchant l'épissage de l'exon alternatif « 5S-like » de l'ARN pré-messager, affectant ainsi la décision d'épissage (HAMMOND *et al.* 2009).

Bien que la plupart des transcrits contenant un PTC résultent d'une erreur d'épissage, plusieurs exemples de gènes montrent qu'il existe une réelle régulation de l'expression de ces gènes en couplant des transcrits alternativement épissés contenant un PTC avec la voie NMD. Il a déjà été démontré, notamment chez l'homme, qu'il existait un processus de régulation de l'expression des gènes couplant l'épissage alternatif et la voie NMD nommé RUST pour « Regulated Unproductive Splicing and Translation » (LAREAU *et al.* 2007; LEWIS *et al.* 2003). Ce mécanisme joue un rôle important dans la régulation des quantités de protéines fonctionnelles en contrôlant les taux de production de l'ARNm codant et de l'ARNm dégradé. La majorité des gènes régulés par le RUST sont des composants de la machinerie d'épissage elle-même (CUCCURESE *et al.* 2005; LAREAU *et al.* 2007; NI *et al.* 2007), ou des ribosomes (CUCCURESE *et al.* 2005; MITROVICH and ANDERSON 2000). L'association entre ces deux voies repose sur la présence d'éléments ultra-conservés. Chez les mammifères, Lareau *et al.* (2007) ont identifié des éléments conservés contenus dans un exon à l'intérieur de gènes codant pour des protéines riches en serine et arginine (protéines SR). Ces exons conservés donnent, lorsqu'ils ne sont pas épissés, des transcrits contenant un PTC. Comme dans le cas de TFIIIA chez Arabidopsis, lorsque ces protéines SR sont en abondance, elles vont affecter l'épissage de leur propre gène afin d'augmenter la proportion du transcrit cible

de la voie NMD afin de réguler leur homéostasie.

Objectifs des travaux de thèse

Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de caractériser le facteur de transcription TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana* (MATHIEU *et al.* 2003b). Lors de cette étude, deux ADNc ont été mis en évidence (VAILLANT 2006). En effet, comme décrit dans la synthèse bibliographique (Chapitre TFIIIA IV.I.), le gène TFIIIA d'Arabidopsis possède un exon qui est ou non maintenu dans l'ARNm, donnant les formes EI et ES, respectivement. Le transcrit ES donne la protéine TFIIIA une fois traduit. Le transcrit EI, quant à lui, possède un codon stop prématuré dans l'exon alternatif. Il va être reconnu par une voie de dégradation des ARNm aberrants (NMD). Par la suite, des études ont confirmé les observations faites par notre équipe concernant l'épissage alternatif du pré-messager de TFIIIA (FU *et al.* 2009; HAMMOND *et al.* 2009; VAILLANT 2006; YOINE *et al.* 2006). Les travaux de Fu *et al.* et Hammond *et al.* ont permis d'établir l'hypothèse selon laquelle cet épissage alternatif et donc le ratio ES/EI sont dépendants des besoins en ARNr 5S de la cellule. Cependant, l'ensemble de ces études a été mené avec des constructions de type gène-rapporteur du gène TFIIIA exprimées chez Arabidopsis ou dans le tabac, ou en conditions *in vitro.*

L'objectif de ma thèse était d'étudier la régulation de l'expression de TFIIIA ainsi que son implication dans l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*. Pour cela, nous avons décidé d'étudier l'expression des transcrits TFIIIA ainsi que l'accumulation de la protéine et l'accumulation des ARNr 5S dans la plante. Nous avons également voulu tester la traduction potentielle du transcrit EI. En effet, ce transcrit, bien que cible de la voie de dégradation NMD, s'accumule de façon stable dans la plante. De plus, le codon stop de l'exon alternatif est suivi d'un deuxième codon initiateur de la traduction. Ce transcrit possède donc deux ORF donnant deux protéines putatives : l'une contenant les deux premiers doigts de zinc de TFIIIA et la deuxième, les sept derniers.

Afin de mener cette étude, nous avons choisi deux fenêtres de temps qui nous semblaient cruciales :

i) la première phase étudiée correspond à la phase reproductive. En effet, la graine est connue pour accumuler d'importantes réserves en ARN et protéines diverses, pour le développement futur de l'embryon après la germination. Il a d'ailleurs été démontré que la graine accumulait de fortes quantités d'ARNr 5S (MATHIEU *et al.* 2003a), situation qui rappelle

celle de l'ovocyte de xénope qui accumule à la fois de grandes quantités d'ARNr 5S et de TFIIIA (GINSBERG *et al.* 1984). La question était donc de savoir s'il en était de même dans la graine. Les stades amenant à cette graine mature, c'est-à-dire les fleurs et les siliques, ont été également étudiés.

ii) la deuxième phase observée concerne les premiers jours après la germination. En effet, cette période est intéressante puisqu'elle fait suite au stade graine et qu'elle correspond au développement de la plantule. De plus, ces stades ont fait l'objet de nombreuses études où Julien Douet a notamment démontré que la chromatine d'ADNr 5S se réorganisait en passant par une étape de forte décompaction (DOUET *et al.* 2008). Il était donc intéressant d'observer l'accumulation du facteur de transcription TFIIIA à une période où l'ensemble des gènes d'ARNr 5S (majoritaires et minoritaires) est potentiellement accessible alors que seule une fraction des gènes 5S est normalement transcrite.

Résultats

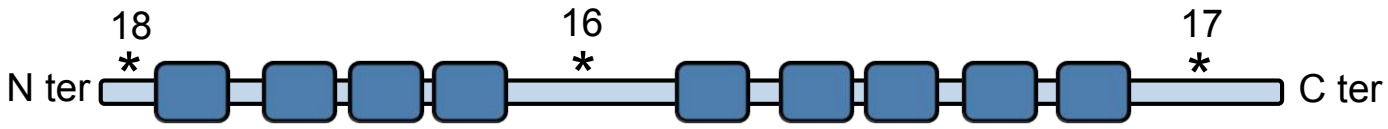


Figure 20 : Localisation des sites de reconnaissance des anticorps anti-TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*.
La position des trois anticorps anti-TFIIIA dont nous disposons est symbolisée par un astérisque. Les anticorps 18, 16 et 17 reconnaissent un peptide en région N-terminale, centrale et C-terminale, respectivement. Les neuf doigts de zinc de la protéine TFIIIA sont symbolisés par les carrés bleus foncés.

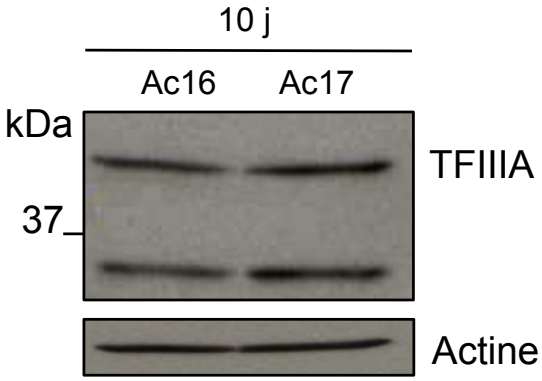


Figure 21 : Les anticorps Ac16 et Ac17 révèlent la protéine TFIIIA et une protéine plus courte.
Un western blot a été réalisé à partir d'un même extrait total d'une plantule de 10 jours d'Arabidopsis, d'écotype Columbia et hybridé avec l'anticorps Ac16 pour la partie gauche de la piste et avec l'anticorps Ac17 pour la partie droite de la piste. La protéine TFIIIA pleine longueur ainsi qu'une deuxième bande plus petite sont détectées. L'actine sert de contrôle de dépôt.

I. Rôle du transcrit EI

Avant mon arrivée au laboratoire, l'amplification de l'ADNc du gène TFIIIA avait mis en évidence deux produits d'amplification, aujourd'hui nommés ES et EI (VAILLANT 2006). Le transcrit ES, une fois traduit, donne la protéine TFIIIA pleine longueur, contenant les 9 doigts de zinc, fonctionnelle, c'est-à-dire capable d'induire la transcription des gènes d'ARNr 5S (MATHIEU *et al.* 2003b). Bien que le transcrit EI soit, lui, une cible de la voie NMD (YOINE *et al.* 2006), son accumulation est, en effet, 17 fois plus importante dans un mutant de cette voie, il n'en reste pas moins qu'il s'accumule de façon stable dans l'ensemble des tissus testés comme les cotylédons, les fleurs et les siliques (Cf. Article). Ce transcrit EI contient deux ORF putatives : la première, nommée ORF 1, composée des 3 premiers exons et la deuxième, ORF 2, composée des 3 derniers (Figure 17 Synthèse bibliographique partie TFIIIA). Ces deux ORF codent pour deux protéines putatives : environ 10 kDa pour celle correspondant à l'ORF 1 qui contiendrait les deux premiers doigts de zinc de TFIIIA et environ 36 kDa pour celle codée par l'ORF 2 qui serait composée des sept derniers doigts de zinc.

Dans un premier temps, il était important de vérifier si ce transcrit pouvait ou non être traduit. En effet, au début de ma thèse, les travaux de Fu *et al.* et Hammond *et al.* (2009) n'avaient pas encore été publiés et aucune donnée sur la traduction de EI n'était donc disponible.

La protéine TFIIIA codée par le transcrit ES et celle de 36 kDa putativement codée par l'ORF 2 de EI présentent la même séquence primaire. L'utilisation des anticorps Ac16 et Ac17 respectivement dirigés contre la partie centrale et C-terminale de TFIIIA devait nous permettre de détecter les deux protéines et de les distinguer par leur différence de poids moléculaire (Figure 20).

Sur les premiers western blots réalisés deux bandes ont effectivement été révélées: une correspondant à la protéine TFIIIA et une, de poids moléculaire proche de celui attendu pour la protéine de l'ORF 2 (Figure 21). La mise en évidence d'une corrélation entre le niveau d'expression du transcrit EI et la détection de la protéine « ORF 2 » étayait l'hypothèse de la traduction de l'ORF 2 du transcrit EI. En effet, les premières expériences de RT-PCR menées sur les cotylédons ont montré que le transcrit EI était d'abord fortement accumulé entre 2 et 5 jours post-germination puis qu'il diminuait à partir du 10ème jour (Cf. figure 1B Article). En

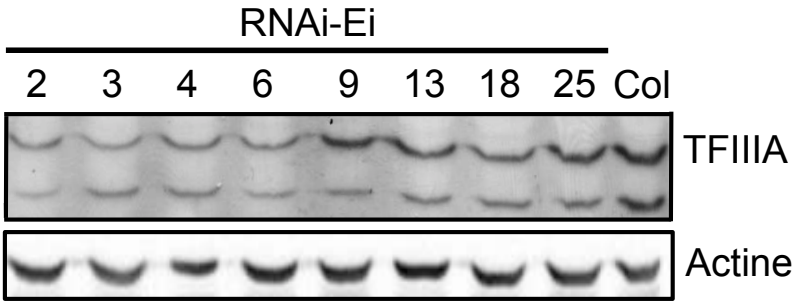


Figure 22 : Certaines lignées « RNAi-EI » présentent des quantités variables de TFIIIA et de l'isoforme courte.
Des western blots hybridés avec l'Ac 17 ont été réalisés à partir d'extraits totaux de plantules de 10 jours de différentes lignées monolocus « RNAi-EI » à la génération T3. L'actine sert de contrôle interne.

ce qui concerne la production protéique, la bande « ORF2 », visualisée en western blot, suivait un profil similaire, avec une diminution de son accumulation à 10 jours post-germination (Cf. figure 4C Article). Ces résultats sont présentés et expliqués en détail dans l'article inséré dans cette partie Résultats.

Afin de vérifier si cette protéine était codée par l'ARNm EI et de tester le rôle potentiel de cette protéine, plusieurs stratégies ont été envisagées.

I.1. Etablissement de lignées RNAi-EI

L'une des premières stratégies choisie a été de créer une lignée qui sous-exprimerait le transcrit EI et par conséquent, sa protéine putative. Il fallait donc cibler spécifiquement le transcrit EI. La seule différence notable entre ES et EI étant la présence de l'exon alternatif « 5S-like » dans EI, nous avons décidé de cloner cet exon dans le vecteur pHellsgate issu de la stratégie Gateway, conseillé pour les plantes dicotylédones (CSIRO, Australia). La particularité de ce vecteur est que l'insert, ici l'exon alternatif, est cloné de façon à obtenir après transcription du vecteur une structure en épingle à cheveu (Annexe). Cet ARN double brin est ensuite pris en charge par la voie du silencing post-transcriptionnel ou PTGS, permettant ainsi le ciblage du transcrit EI grâce à des siRNA spécifiques de l'exon alternatif « 5S-like ». Le transcrit ciblé est ensuite dégradé, entraînant ainsi une diminution de son expression. Des plantes d'Arabidopsis de l'écotype Columbia ont été transformées avec ce vecteur, permettant d'obtenir des lignées nommées RNAi-EI.

Une fois l'expression de la construction vérifiée par RT-PCR dans les plantes transformées, des western blots ont été réalisés à partir d'extraits totaux de plantules pour lesquelles l'insertion du vecteur était « monolocus ». Certaines lignées étudiées ont présenté des diminutions de la forme courte, sans altérer l'accumulation de la protéine pleine longueur TFIIIA, alors que certaines lignées RNAi-EI présentaient à la fois une diminution de la forme courte et une diminution de la protéine TFIIIA pleine longueur (Figure 22). Le fait d'obtenir des lignées présentant une diminution du facteur de transcription pleine longueur n'est pas surprenant. Dans un premier temps, les siRNA produits à partir de l'exon alternatif « 5S-like » ne ciblent que le transcrit EI. Une fois le transcrit EI dégradé, des siRNA transitifs vont être produits à partir de l'ensemble de l'ARNm EI. Le transcrit EI ne différant de ES qu'au niveau de l'exon alternatif, les nouveaux siRNA vont pouvoir également cibler et

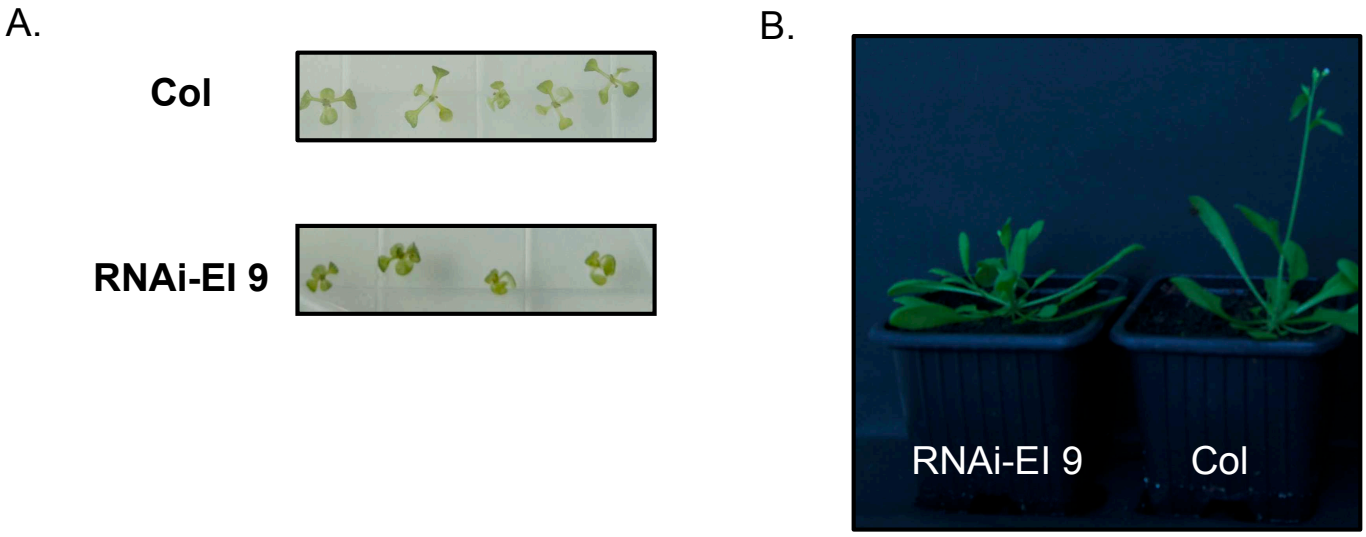


Figure 23 : La lig` ée RNAi-EI 9 prése` te u` retard de floraiso` par rapport à u` e pla` te sauvage.

A. Des graines d'*Arabidopsis thaliana,* écotype Columbia (Col), et de la lignée RNAi-EI 9, en génération T3, ont été semées sur milieu ATG. Les photos ont été prises 10 jours après la germination.

B. Des graines d'*Arabidopsis thaliana,* écotype Columbia (Col), et de la lignée RNAi-EI 9, en génération T4, ont été semées sur du terreau. Les photos ont été prises environ 4 semaines après la germination.

dégrader le transcrit ES. Le problème majeur rencontré avec ces lignées a été le manque de reproductibilité des résultats obtenus. En effet, d'une génération à l'autre, l'altération de l'expression des deux formes de protéines était variable. D'un point de vue phénotypique, certaines lignées présentaient un retard de floraison par rapport à une plante sauvage (Figure 23). La conclusion que nous avons pu tirer de ces lignées RNAi-EI est que la présence de ce vecteur de « silencing », et donc la production de siRNA ciblant la dégradation de EI voire de ES, avait fortement perturbé l'expression du gène TFIIIA.

I.2. Etablissement de lignées étiquetées à partir des ORF 1 et 2 du transcrit EI

En même temps que nous réalisions les lignées RNAi-EI, nous avons établi deux autres lignées transgéniques. La première lignée a été obtenue par transformation d'une lignée sauvage d'Arabidopsis, d'écotype Columbia, par une construction nommée pORF1-Flag (Annexe). Ce vecteur consiste en une surexpression de la première ORF de EI, étiquetée en 3' avec une séquence codant pour une étiquette Flag. La deuxième construction nommée pORF2-StrepII, consiste en une surexpression de la 2ème ORF de EI étiquetée en 3' avec une séquence codant pour une étiquette Strep II (Annexe). Ces deux constructions sont sous le contrôle d'un promoteur fort, le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), nommé p35S, afin d'obtenir une expression importante des construits.

Ces lignées avaient pour but d'étudier l'effet de la surexpression de ces deux formes sur l'expression des ARNr 5S chez Arabidopsis et donc de déterminer leurs rôles potentiels ainsi que de détecter les deux formes avec des anticorps dirigés contre les étiquettes, Flag et StrepII. L'expression de ces vecteurs a été vérifiée dans des plantes de la génération T1. L'insertion « monolocus » du vecteur a été vérifiée à la génération T2. Cependant, les premiers western blots réalisés sur des plantes de la génération T1, dont le vecteur s'exprime, n'ont pas permis de mettre en évidence les protéines étiquetées codées par ces constructions, que ce soit avec un anticorps anti-Flag pour les lignées pORF1-Flag ou avec un anticorps anti-StrepII pour les lignées pORF2-StrepII.

Les résultats obtenus avec les lignées RNAi-EI et les lignées complémentées (Cf. I.4 ci-dessous), font que la priorité des travaux s'est détournée de ces lignées de surexpression qui avaient été développées dans le cadre de l'hypothèse de la traduction de l'ARNm EI. Ces

lignées sont actuellement en génération T2, c'est-à-dire, deux générations après la transformation. L'intérêt de ces deux lignées dans la poursuite de la caractérisation de TFIIIA dépendra des résultats futurs et sera abordée dans la partie discussion de ce manuscrit.

I.3. Etablissement de lignées de complémentation du mutant TFIIIA

En parallèle à l'étude des lignées RNAi-EI, nous avions commencé l'établissement de lignées de complémentation du mutant TFIIIA. Ce mutant est létal à l'état homozygote, la plante ne peut vivre en l'absence du facteur de transcription des gènes d'ARNr 5S. Le mutant TFIIIA utilisé pour ces expériences de complémentation est un mutant d'insertion, disponible à l'état hétérozygote (TFIIIA +/- ; T-DNA/-). Cette expérience avait pour but de sauver le génotype létal (TFIIIA -/- ; T-DNA/T-DNA). Pour cela, trois constructions ont été réalisées :

a. une construction exprimant uniquement le transcrit ES, générant une lignée nommée ES-plants,
b. une construction exprimant uniquement le transcrit EI, générant une lignée nommée EI-plants,
c. une construction génomique permettant d'exprimer les deux transcrits, générant une lignée nommée geno-plants.

Ces constructions sont sous le contrôle du promoteur endogène du gène TFIIIA et sont présentées en détail dans l'article qui fait suite à ces résultats (Cf. Article). Si nous retrouvons des plantes mutantes (TFIIIA -/- ; T-DNA/T-DNA) viables dans la descendance des plantes transformées, alors la présence du ou des transcrits exprimés par la construction permet la complémentation de la mutation. Le mutant TFIIIA a pu ainsi être complémenté par les constructions portant le gène TFIIIA entier (c) et par la construction ES (a). En revanche, aucune plante homozygote pour la mutation de TFIIIA endogène n'a été retrouvée dans la descendance de lignées EI-plants (b). Nous pouvons donc conclure que le transcrit ES seul, est capable de restaurer l'activité TFIIIA dans des mutants alors que le transcrit EI en est incapable.

I.4. Le transcrit EI n'est pas à l'origine de l'isoforme courte

La lignée mutante TFIIIA complémentée par le transcrit ES a permis de mettre en évidence que le transcrit EI n'était pas à l'origine de l'isoforme courte détectée avec nos anticorps spécifiques de TFIIIA. En effet, des western blots réalisés sur ces plantules de 10 jours, ont révélé la présence de la protéine TFIIIA pleine longueur mais également celle de la protéine plus courte (Cf. supplementary data 1 Article) en absence du transcrit EI pleine longueur. Si cette protéine provenait de la traduction de ce transcrit EI, elle ne serait pas présente dans ces lignées complémentées où seul le transcrit ES est présent. Ces expériences confirment que le transcrit EI n'est pas à l'origine de cette isoforme courte et qu'il ne semble pas traduit, corroborant les conclusions de Fu *et al.* et Hammond *et al.* (2009). Cette protéine étant révélée spécifiquement par deux anticorps de TFIIIA, elle ne peut provenir que d'un clivage protéolytique de TFIIIA. Ces résultats démontrent également que l'absence du transcrit EI n'empêche pas le développement de la plante et que celle-ci peut se passer de l'épissage alternatif du gène TFIIIA dans des conditions normales de croissance en laboratoire.

II. Le taux de la protéine TFIIIA dans la cellule est à la fois contrôlé par l'épissage alternatif du gène TFIIIA et par le clivage protéolytique de TFIIIA

Les résultats qui viennent d'être présentés, nous ont permis de conclure que seul le transcrit ES est capable de restaurer l'activité de transcription des gènes d'ARNr 5S dans un mutant TFIIIA. La protéine TFIIIA, traduite à partir du transcrit ES, est donc la seule protéine traduite à partir du gène TFIIIA. Or, l'analyse protéique de TFIIIA dans des plantes sauvages, réalisée avec les deux anticorps spécifiques de TFIIIA, a permis de mettre en évidence la protéine TFIIIA pleine longueur et une autre protéine plus petite, que nous nommerons TFIIIA-C, puisqu'elle correspond à la partie C-terminale de la protéine TFIIIA. La forme TFIIIA-C est également présente dans des plantes complémentées par ES dans lesquelles le transcrit EI est absent. Cette protéine ne pouvant résulter de la traduction de EI, TFIIIA-C proviendrait donc du clivage protéolytique de TFIIIA.

Les travaux concernant l'expression de TFIIIA pendant le développement de la plante sont rapportés dans l'article qui suit et résumés ci-dessous :

L'étude des lignées complémentées par la forme ES a permis de montrer qu'en conditions de croissance normale en laboratoire, l'exon alternatif « 5S-like » et donc le mécanisme d'épissage alternatif du gène TFIIIA n'était pas indispensable à la vie de la plante. De plus, dans ces plantes complémentées qui surexpriment la forme ES, la quantité d'ARNr 5S et de protéines TFIIIA est identique aux plantes sauvages. Il semble donc que tous les transcrits ES ne soient pas traduits, et qu'un niveau supplémentaire de régulation se mette en place.

L'analyse des transcrits ES et EI, de l'accumulation de TFIIIA et de sa forme clivée TFIIIA-C, ainsi que du taux des transcrits 5S a été réalisée pendant deux phases importantes du développement de la plante : la phase de maturation de la graine qui accumule des réserves, notamment des ARNr 5S (Mathieu *et al.* 2003b) et les premiers jours après la germination où la chromatine d'ADNr 5S se réorganise (Douet *et al.* 2008). Lors de la phase reproductive, la forte accumulation de la protéine TFIIIA et donc, par conséquent d'ARNr 5S, est à la fois possible grâce à l'augmentation de la quantité de la forme ES et à la diminution du clivage protéolytique. Lorsque la « chromatine 5S » se réorganise, le clivage protéolytique

est tel que la protéine TFIIIA n'est pas détectée. Alors qu'au 5ème jour après la germination, lorsque la chromatine d'ADNr 5S est mature et apte à la transcription, il y a reprise de l'accumulation des ARNr 5S et de la protéine TFIIIA, le clivage protéolytique étant moins important. Cette analyse a permis de montrer que l'expression des transcrits ES et EI, la direction de l'épissage alternatif et le clivage protéolytique de TFIIIA sont des mécanismes clés permettant le contrôle du taux de TFIIIA et par conséquent du taux d'ARNr 5S dans la plante au cours du développement de cette dernière.

Transcription levels, alternative splicing and proteolytic cleavage of TFIIIA control 5S rRNA accumulation during *Arabidopsis thaliana* development

Layat E., Cotterell S., Vaillant I., Yukawa Y., Tutois S. and Tourmente S.

En soumission à Plant Journal

ABSTRACT

Ribosome biogenesis is critical for eukaryotic cells and requires coordinated synthesis of the protein and rRNA moieties of the ribosome, which are therefore highly regulated. 5S ribosomal RNA, an essential component of the large ribosomal subunit, is transcribed by RNA polymerase III and specifically requires Transcription Factor IIIA (TFIIIA).

To gain insight into the regulation of 5S rRNA transcription, we have investigated the expression of 5S rRNA, the exon-skipped (ES) and exon-including (EI) TFIIIA transcripts, two transcript isoforms that result from the alternative splicing of the *TFIIIA* gene, and TFIIIA protein amounts in respect to distinct requirements of 5S rRNA during development.

We show that 5S rRNA quantities are regulated through distinct, but complementary mechanisms operating both through a transcriptional and post-transcriptional control of TFIIIA transcripts as well as at the post-translational level through proteolytic cleavage of the TFIIIA protein.

During the reproductive phase, high expression of the *TFIIIA* gene together with low proteolytic cleavage contributes to the accumulation of functional, full-length TFIIIA protein, and results in 5S rRNA accumulation in the seed. In contrast, just after germination, amounts of TFIIIA-coding transcripts are low and stable. Nevertheless, full-length TFIIIA protein is undetectable, and 5S rRNA stored in the embryo progressively decreases. After day 4, in correlation with the described reorganization of 5S rDNA chromatin to a mature state, full-length TFIIIA protein that possesses transcriptional activity accumulates and consequently permits *de novo* transcription of 5S rRNA.

CONFIDENTIAL

INTRODUCTION

Ribosome biogenesis in eukaryotic cells requires the synthesis of RNAs by all three nuclear RNA polymerases. RNA polymerase II (Pol II) produces mRNAs that encode ribosomal proteins. The 5.8S, 18S and 28S ribosomal RNAs are transcribed in the nucleolus by RNA polymerase I (Pol I), while 5S ribosomal RNA (rRNA) is transcribed by RNA polymerase III (Pol III). Transcription factor IIIA (TFIIIA), specifically required for transcription of 5S RNA genes, binds to the internal control region of these genes as the first step in the assembly of a transcription complex, allowing for the recruitment of TFIIIC, TFIIIB and Pol III (Bieker *et al.,* 1985; Setzer and Brown 1985). The TFIIIA protein, present in every organism, has been characterized in several species including *Arabidopsis thaliana.* It shows remarkably poor conservation of sequence (Mathieu *et al.,* 2003b and references therein) but all proteins analyzed carry nine C2H2-zinc fingers involved in DNA binding, except TFIIIA from *S. pombe* which contains a tenth finger. TFIIIA binds both 5S ribosomal DNA (rDNA) and 5S rRNA and directs expression of the 5S rRNA (Camier *et al.,* 1995) that is required for the assembly of the large ribosomal subunit.

Regulation of ribosome biogenesis is critical for the cell, and synthesis of the rRNA (by Pol I and Pol III) and protein (by Pol II) moieties of the ribosome needs to be highly regulated (Laferte *et al.,* 2006). A network of nucleic acid-protein interactions involving 5S rRNA, the 5S RNA gene, TFIIIA and the ribosomal protein L5 was proposed to contribute to the homeostatic control of ribosome assembly in Xenopus embryo (Pittman *et al.,* 1999).

The Arabidopsis *TFIIIA* gene consists of seven exons, the third of which results from a 5S RNA exonization in the gene. This exon, which bears considerable similarity in

CONFIDENTIAL

large-scale reorganization of 5S rDNA chromatin. 5S rDNA chromatin undergoes a decondensation followed by a 're'condensation to finally at 5 days organize in a loop structure as observed in mature leaf nuclei (Douet *et al.,* 2008; Mathieu *et al.,* 2003a). This reorganization of 5S rDNA chromatin is accompanied by a rapid and active demethylation of 5S rDNA mediated by the ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) demethylase, whereas the plant-specific RNA polymerases IV and V are essential for 5S rDNA chromatin 're'condensation (Douet *et al.,* 2008). However, how the plant accommodates 5S rRNA transcription during chromatin remodeling remains an intriguing question. To gain insight into the regulation of 5S rRNA transcription in respect to distinct requirements of 5S rRNA during development, we have investigated the correlation between the levels of 5S rRNA, ES and EI TFIIIA transcripts and TFIIIA protein amounts during the two developmental phases and tested the requirement for an alternative exon in TFIIIA for proper 5S rRNA expression.

We show that 5S rRNA quantities are regulated during development through distinct complementary mechanisms operating both at the level of the transcriptional and post-transcriptional control of TFIIIA transcripts as well as at the post-translational level through proteolytic cleavage of the TFIIIA protein. During the reproductive phase, high expression of the *TFIIIA* gene together with low proteolytic cleavage contributes to the accumulation of functional, full-length TFIIIA protein, and results in 5S rRNA accumulation in the seed. In contrast, just after germination, ES transcript amounts are stable, but full-length TFIIIA protein is undetectable, and 5S rRNA stored in the embryo progressively decrease. After day 4, in correlation with the remodeling of 5S rDNA chromatin to a mature state, full-length TFIIIA protein that

CONFIDENTIAL

possesses transcriptional activity accumulates and consequently permits *de novo* transcription of 5S rRNA.

CONFIDENTIAL

RESULTS

The gene coding for the transcription factor TFIIIA produces alternatively spliced transcripts (Yoine *et al.,* 2006). The exon-skipping (ES) mRNA isoform is 1524 bp long and predicted to code for TFIIIA. The exon-inclusion (EI) transcript isoform, 1699 bp long, which contains two ORFs (open reading frames) is degraded through the NMD pathway, thereby expected to control TFIIIA protein and consequently 5S rRNA amounts (Figure 1A). To gain insight into the mechanisms that control 5S rRNA regulation during development, we chose to investigate ES and EI transcript levels in relation to TFIIIA protein amounts and 5S rRNA levels during two developmental phases characterized by distinct requirements for 5S rRNA: the first days of post-germination development of the seedling and the reproductive phase.

Post-transcriptional regulation of TFIIIA during development

To understand how 5S rRNA transcription is controlled during plant development, we first investigated the regulation of the functional (ES) spliced form of the TFIIIA transcript during development. We extracted total RNA from cotyledons of plantlets at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination and performed RT-PCR with two primers (primers a and b, Figure 1A) spanning the site of alternative splicing. Using these primers we can amplify both forms of the TFIIIA transcripts in a single PCR reaction (Figure 1). The resulting fragments were 649 bp and 474 bp long for EI (NMD-degraded) and ES (TFIIIA-coding) transcripts, respectively. Through this regulation a stable amount of the functional ES transcript (around 0.20) relative to actin is achieved during post-germination development. The resulting ES/EI ratio is low and

CONFIDENTIAL

stable (0.30) between 2 and 4 days post-germination, but then increases progressively from 4 to 10 days (0.63) post-germination (Figure 1B).

We also determined the amount of functional ES transcripts and the ES/EI ratio in different tissues of the reproductive phase *i.e.* flowers, fresh and old siliques, and mature seeds by RT-PCR. During the reproductive phase, both the total amount of ES transcripts, as well as the ES/EI ratio significantly increase from flowers to old siliques (Figure 1C). Interestingly, there is a switch in the splicing towards the EI transcript in the late reproductive phase, since only the EI transcript could be amplified in mature seeds (Figure 1D).

Taken together, during post-germination development of the seedling and in particular during reproductive development, amounts of the functional ES transcript are controlled both at the level of transcription and by alternative splicing.

Only the ES transcript is able to restore proper TFIIIA expression

To further gain insight into the respective fates of the ES and EI transcripts, with the ES transcript encoding the TFIIIA protein and EI being a target of the NMD pathway, we tested whether plants carrying a mutation in the *TFIIIA* gene can be complemented by chimeric genomic/cDNA constructs driven by the endogenous promoter (Figure S1 and material and methods), that express only one transcript isoform. A TFIIIA homozygous mutant resulting from a T-DNA insertion in the fifth exon (Figure 2A) of the gene is lethal. We first confirmed that lethality resulted from the TFIIIA mutation. To this aim we transformed TFIIIA heterozygous mutants with a genomic construct containing the *TFIIIA* gene with its endogenous promoter. After genotyping, we could recover plants homozygous for the TFIIIA mutation and

CONFIDENTIAL

complemented with the TFIIIA transgene that show a WT phenotype suggesting that lethality was caused by the lack of a functional *TFIIIA* gene and not a secondary mutation.

We then transformed TFIIIA heterozygous mutants with our chimeric genomic/cDNA constructs (Figure S1). When TFIIIA heterozygous mutants were transformed with an ES construct, viable plants homozygotes for the TFIIIA mutation and complemented with the ES isoform were obtained. In contrast, when transformed with the EI construct, despite the large number of genotyped plants, we could never recover plants homozygous for the TFIIIA mutation.

These results show that the unique presence of the EI isoform does not allow plant development. On the contrary, plants expressing solely the ES transcript that codes for TFIIIA are viable.

ES overexpression does not increase 5S rRNA levels

TFIIIA mutant plants complemented with the ES construct (later called ES-plants) show 10 times more ES transcripts than WT plants at 10 days post-germination as revealed by RT-PCR (Figure 2B). Surprisingly, a low amount of endogenous EI mRNA is detected (Figure 2B). However, RT-PCR analysis with primers located upstream and downstream of the T-DNA (primers c and d) confirmed the absence of the full length EI endogenous transcript in homozygous mutants (Figure 2C). The EI transcript amplified with primers flanking the alternative exon must be therefore partial (upstream of T-DNA), and is probably unstable. Since ES-plants show ES isoform overexpression at 10 days of development, we were wondering whether the strong accumulation of the ES isoform (encoding the TFIIIA protein) results in

CONFIDENTIAL

increased 5S rRNA amounts. For this, we have studied the 5S rRNA quantity by Northern blot in plantlets at 10 days post-germination in WT and ES-plants. Surprisingly, equivalent amounts of 5S rRNA were observed in these plants (Figure 2D).

Taken together, TFIIIA mutant plants can be complemented by a construct expressing solely the ES isoform. Even though these plants produce very different amounts of ES mRNA, equivalent amounts of 5S rRNA accumulate in ES and WT plants, which is in agreement with the WT phenotype observed in these plants. These results suggest however, that even though the inclusion of the alternative exon and the resulting degradation of the transcript by the NMD pathway (Yoine *et al.,* 2006) represent a way to regulate the amount of TFIIIA protein and consequently 5S rRNA, additional mechanisms of regulation either at the level of mRNA translation or at the level of the TFIIIA protein itself must exist.

CONFIDENTIAL

TFIIIA protein undergoes proteolytic cleavage

To explore the hypothesis of a potential regulation of 5S rRNA amounts by fine-tuning the amount of TFIIIA protein, we produced two polyclonal antibodies against TFIIIA. The antibodies were respectively raised against a peptide present in the central region of the protein (antibody 16) and a peptide present in the C-terminal region of the protein (antibody 17) (Figure 3A). Interestingly, we observed two bands: one corresponding to the full-length (44 Kda) TFIIIA protein and another lower band of 34Kda (Figure 3B). The precise size of the two proteins was determined on gradient gels (not shown). The same two bands were revealed with antibody 16 and 17 (figure 3B). To corroborate that both bands are indeed TFIIIA proteins, we

depleted TFIIIA specific antibodies by incubation with full-length GST-TFIIIA protein before revelation. Indeed, this pre-incubated antibody failed to reveal any of the two bands while pre-incubation with GST protein alone had no effect (Figure 3C). This confirms that both bands correspond to TFIIIA and that TFIIIA undergoes proteolytic cleavage to result in a shorter TFIIIA isoform that we named TFIIIA-C. According to the position of the peptides used to raise both antibodies (Figure 3A), the shorter TFIIIA isoform corresponds to the C-terminal part of the TFIIIA protein.

The transcriptional function requires the full-length TFIIIA protein

We previously observed that the full length TFIIIA protein is able to transcribe 5S rRNA *in vitro* (Mathieu *et al.,* 2003b). We used the same *in vitro* transcription system from tobacco cells (Fan and Sugiura 1995; Yukawa *et al.,* 1997) to test whether a TFIIIA protein lacking the N-terminal extremity (ΔN-TFIIIA) is able to transcribe 5S rRNA. A basal level of 5S RNA gene transcription is observed without addition of the recombinant protein (Figure 3D, lane *). Addition of increasing concentrations of GST-ΔN-TFIIIA did not stimulate the 5S RNA gene transcription, similar to increasing concentrations of the GST alone. As a control, transcription of a 5S RNA gene was stimulated with the recombinant GST-TFIIIA full-length protein. These results illustrate that a TFIIIA protein missing the N-terminal extremity is unable to stimulate the transcription of a 5S RNA gene *in vitro*.

CONFIDENTIAL

Contribution of proteolytic cleavage of TFIIIA to the regulation of 5S rRNA during development

To test whether the suggested proteolytic cleavage of TFIIIA protein could play a role in the regulation of 5S rRNA during development, we performed western blot analysis on whole proteins extracts from flowers, fresh and old siliques and seeds. Interestingly, the amounts of the two forms of the TFIIIA protein vary considerably during reproductive development. The same profiles were obtained with both antibodies (middle and C-ter), but are only shown for the C-terminal antibody 17. While in flowers both TFIIIA and TFIIIA-C are present at similar ratios as in 10 day-old seedlings (Figure 3B and 4A), only very low amounts of TFIIIA can be revealed in extracts from fresh siliques. Full length TFIIIA protein then progressively accumulates from fresh siliques to seeds (Figure 4A) concomitant with lower proportions of the shorter TFIIIA protein. In accordance with the observation of high levels of ES transcripts in old siliques (Figure 1C), total TFIIIA protein amounts (TFIIIA + TFIIIA-C) increase substantially during seed maturation. This suggests that during silique development, increasing quantities of total TFIIIA protein together with the absence of proteolytic cleavage leads to particular high levels of TFIIIA in the seed. To test how the accumulation of full-length TFIIIA impacts transcription of 5S rRNA, we analyzed 5S rRNA quantities by Northern blot in flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Indeed, we observed a progressive and significant accumulation of 5S rRNA, so that the seed contains 3 times more 5S rRNA than flowers (Figure 4B).

We then carried out western blot analysis on whole protein extracts from cotyledons at day 2, 3, 4, 5 and 10 post-germination development. Interestingly, and in contrast to seeds only the shorter TFIIIA protein is present from day 2, while the full length

CONFIDENTIAL

TFIIIA protein is reproducibly detectable only after day 4. The same profiles were obtained with both antibodies (middle and C-ter), but are only shown for the C-terminal antibody 17 (Figure 4C). These results suggest that the TFIIIA protein carried over from the seed as well as the one produced during early development is completely cleaved and degraded and consequently undetectable until day 4. Only from day 5 on full-length TFIIIA protein starts to be revealed. Taken together, while the levels of the ES transcript isoform are relatively constant during the early days post-germination development (Figure 1B), levels of functional TFIIIA protein change considerably during post-germination development (Figure 4C).

To test how the absence of functional TFIIIA full-length protein impacts 5S rRNA quantities in the developing cotyledons, we analyzed the 5S rRNA amounts by Northern blot. After germination, between days 2 and 4, the 5S rRNA amount decreases significantly (Figure 4D) probably due to the gradual use of 5S rRNA that had been stored in embryonic tissue during seed maturation (Figure 4B) and the absence of *de novo* transcription due to lack of functional TFIIIA protein (Figure 4C). From day 4 post-germination, the 5S rRNA levels increase again; interestingly, it correlates with an accelerated increase of cotyledons weight (Figure S2); and significantly higher levels of 5S rRNA are present at 10 days post-germination compared to day 4. This progressive accumulation of 5S rRNA correlates with the detection of functional TFIIIA protein from day 5 by Western Blot (Figure 4C).

Different mechanisms control 5S rRNA quantities during development

In summary, our results illustrate how changes in TFIIIA splice products and TFIIIA protein isoforms control 5S rRNA amounts required at specific developmental stages.

CONFIDENTIAL

Indeed, production of the full-length TFIIIA transcription factor, required for 5S rRNA transcription, results from the combination of both ES-isoform expression and proteolytic cleavage efficiency as resumed on Figure 5.

During the reproductive phase, the total amount of protein increases significantly (up to 8 fold) in correlation with the 4-fold increase in ES transcript levels. In addition, whereas the cleaved TFIIIA isoform represents 90% in fresh siliques, it is absent in seeds. Inversely, the full-length TFIIIA protein accumulates leading to a buildup of 5S rRNA in the seed.

In contrast, the total amount of TFIIIA protein (TFIIIA + TFIIIA-C) does not significantly vary during post-germination development in agreement with low but stable quantities of ES transcripts at this time. However, the cleavage of the TFIIIA protein decreases during this period: the cleaved-isoform represents 100% at days 3 and 4, whereas it represents 81 and 58% of the total amount of TFIIIA protein at days 5 and 10 respectively. Inversely, the full-length TFIIIA protein, absent until day 4, is readily detectable thereafter and can explain the increasing 5S rRNA quantities.

These results show that during the post-germination phase, the cleavage efficiency controls the amount of the functional, full-length TFIIIA protein, whereas during seed maturation both post-transcriptional regulation favoring ES transcripts and reduced cleavage efficiency of the protein, control the amounts of the full-length TFIIIA-isoform and thereby 5S rRNA accumulation in mature seeds.

CONFIDENTIAL

DISCUSSION

A fine-tuned regulation of RNA and protein components of the ribosome is critical for proper ribosome biogenesis and cell life (Laferte *et al.,* 2006). Transcription of Arabidopsis 5S rRNA necessitates the transcription factor TFIIIA, an essential protein specific for 5S rDNA. Given the data available for the model organism Xenopus that describe the tight regulation of 5S rDNA expression (Ginsberg *et al.,* 1984; Wolffe 1994), we hypothesized that also in Arabidopsis 5S rDNA transcription is tightly controlled to produce the required amounts depending on the developmental stage or in response to environmental stimuli. One way to control Arabidopsis 5S rRNA transcription is by limiting the availability of its transcription factor TFIIIA. Indeed, TFIIIA expression had been described to be regulated by a post-transcriptional mechanism, since two transcripts are detected that result from an alternative splicing event of the TFIIIA gene (Yoine *et al.,* 2006). The exon-skipping (ES) isoform encodes the fully functional TFIIIA protein, while the exon-inclusion (EI) isoform is degraded through the NMD pathway. The post-transcriptional negative feedback auto-regulation model for TFIIIA gene proposed by Fu *et al.,* (2009) and Hammond *et al.,* (2009) stipulates that either the ES or the EI isoform is favored to upregulate or downregulate TFIIIA production, respectively. Here we have studied how the production of TFIIIA is controlled during distinct developmental phases, the post-germination period and the reproductive phase during which the plantlet and the seed respectively develop. We show that the amount of functional ES transcript is indeed regulated during development both at the level of transcription as well as by the proposed splicing mechanisms (Fu *et al.,* 2009; Hammond *et al.,* 2009), since we observed variation both in absolute amounts of TFIIIA transcripts as well as in the

CONFIDENTIAL

ratio of ES to EI. Compared to plants expressing the EI transcript only, plants expressing the ES transcript isoform in homozygous TFIIIA mutants are viable and these plants display a wild type phenotype under normal growth conditions. This is in accordance with observations from Fu *et al.,* (2009) who reported that ES isoform overexpression lines have no obvious phenotype under standard growth conditions.

In addition to the regulation of TFIIIA transcripts, we found evidence for a mechanism in TFIIIA control that operates at the post-translational level by cleavage of the full-length TFIIIA protein into a non-functional smaller product. Indeed, we showed that only the presence of full-length TFIIIA correlates with *de novo* transcription of 5S rRNA and that different proportions and amounts of the two TFIIIA proteins can be detected during distinct developmental stages. We therefore propose that the amount of functional TFIIIA transcription factor can be fine-tuned at the level of the protein by proteolytic cleavage. If this hypothesis is correct, we should observe elevated TFIIIA protein cleavage in our ES-plants, which lack regulation of TFIIIA transcripts through alternative splicing and which show higher levels of ES transcripts than WT plants. Indeed, we reproducibly observed slightly increased total protein amounts together with higher levels of TFIIIA-C and rather stable TFIIIA amounts in ES-plants (Supplementary Figure 3). The generation of transgenic lines that highly overexpress the ES-transcripts should in future help to consolidate this hypothesis.

The purpose of the reproductive phase is seed production. In the seed high levels of RNA and proteins are stored to allow germination and future plant development (Tan-Wilson and Wilson 2011). During the reproductive phase, the full-length TFIIIA protein, possessing the transcriptional activity (this work and Mathieu *et al.,* 2003b), as well as its transcription product, the 5S rRNA, progressively accumulate. This accumulation is the result of a 4-fold increase in the ES-transcript, reflecting both

CONFIDENTIAL

increase in *TFIIIA* gene expression and a splicing machinery choice towards the ES transcript isoform, resulting in higher TFIIIA protein production, together with a low proteolytic cleavage activity. Mature seeds contain the highest levels of full-length TFIIIA protein we observed, coherent with an absence of the smaller TFIIIA-C protein form, as well as the highest 5S rRNA amounts. TFIIIA protein might serve to store 5S rRNA in seeds like in Xenopus oocytes where 5S rRNA binds to its own transcription factor IIIA, forming 7S ribonucleoprotein particles for storage (Allison *et al.,* 1995; Guddat *et al.,* 1990). In the mature seed, we could reveal only the EI transcript, suggesting that the splicing machinery favors production of this isoform when sufficient amounts of TFIIIA and 5S rRNA have accumulated.

After seed germination (2-10 days post-germination), we observed two phases of 5S rRNA utilization and production in the emerging cotyledons (only cotyledons were harvested to avoid a mixture of tissues). Before day 4, the ES/EI ratio is low, only the TFIIIA-C form and not the functional TFIIIA transcription factor are detectable, and 5S rRNA quantities decrease until day 4. This suggests that before day 4, cotyledons use the 5S rRNA previously accumulated during their embryonic development in the seed. Indeed, at day 2, in addition to the absence of full-length TFIIIA protein, 5S rDNA is highly compacted, methylated and contains repressive histone marks, making its transcription unlikely (Mathieu *et al.,* 2003a). Secondly, seeds and 2-day cotyledons contain the same proportion (20%) of minor 5S rRNA (heterogenous 5S rRNA containing 1 nucleotide substitution), which are produced by the corresponding minor 5S RNA genes during seed development (Mathieu *et al.,* 2003a). At day 3, 5S rDNA is largely decompacted (Douet *et al.,* 2008) and 5S RNA genes are expected to be accessible for transcription factors. The complete proteolytic cleavage of the

CONFIDENTIAL

TFIIIA protein at this stage could prevent transcription of highly mutated 5S rRNA that is deleterious for the cell.

From day 4, 5S rDNA 're'condensates' to form an organization observable in mature nuclei. In this mature organization part of the 5S rDNA is located within heterochromatic chromocenters whereas another fraction forms loops with euchromatic features considered to contain the active 5S RNA genes (Douet *et al.,* 2008; Mathieu *et al.,* 2003a). Concomitant with the newly established 5S rDNA chromatin structure at day 5, full-length TFIIIA and 5S rRNA start to accumulate, but heterogenous 5S rRNAs are absent, reflecting silencing of the corresponding minor 5S genes. This transition is marked by changes in the proportion of the TFIIIA protein isoforms. Accumulation of the full-length TFIIIA protein results mainly from the decreasing cleavage activity, since the amount of ES transcript and the total quantity of TFIIIA protein (quantity of both isoforms) do not vary substantially during the first days post-germination development (Figure 5).

Interestingly, the Arabidopsis nucleolin protein, involved in the transcription of 45S rDNA by RNA polymerase I, is also a target of proteolytic cleavage (Pontvianne *et al.,* 2007; Tuteja and Tuteja 1998). In addition 25S rRNA, which results from 45S pre-messenger maturation, follows the accumulation pattern of 5S rRNA during both reproductive phase and post-germination development (Supplementary Figure 4). However, the kinetics of the nucleolin cleavage in relation to 45S rDNA chromatin reorganization and transcription during Arabidopsis post-germination development (Pontvianne *et al.,* 2010) needs to be explored further.

In Xenopus, early development takes place without zygotic rRNA transcription. The developing Xenopus oocyte has stored transcription and translation factors, as well as 5S rRNA and other rRNAs in preparation for multiple rounds of rapid cell divisions

CONFIDENTIAL

without transcription during early embryogenesis (Wolffe and Brown 1988; Yang and Hayes 2003). Only when the development reaches the mid-blastula transition stage, 5S RNA expression is restored and transcription depends on the newly established 5S rDNA chromatin structure. At the same time, 45S rRNA transcription, that requires the nucleolin protein that itself is a target of proteolysis, is restored in Xenopus (Srivastava and Pollard 1999). It should be mentioned that proteolytic cleavage of Xenopus TFIIIA was also suggested (Kmiec and Worcel 1986). Analogies of rDNA transcriptional regulation between Arabidopsis and animals illustrated by the Xenopus model are intriguing and have already been reported at the level of chromatin regulation (Douet and Tourmente 2007). However, plants as sessile organisms have developed specificities such as the TFIIIA alternative splicing, absent from animals but present in all land plants surveyed, and proposed to have contributed to the adaptation of plants to stress when their ancestors invaded land (Fu *et al.,* 2009; Hammond *et al.,* 2009).

In conclusion, our results show that TFIIIA expression and 5S rRNA transcription are dynamic during development and that the regulation of 5S rRNA implicates an additional level of regulation, that operates through the proteolytic cleavage of TFIIIA, thereby likely preventing 5S RNA transcription at inappropriate time windows during development.

CONFIDENTIAL

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana plants from the Columbia ecotype were grown in soil in a greenhouse with an 18 h photoperiod at 22°C or on agar plates containing MS medium (MS salt, Duchefa biochimie) supplemented with 1% sucrose and 8% BactoAgar, into a growth chamber at 23°C with a 16h photoperiod, after synchronization for 2 days at 4°C. Cotyledons were collected at 2, 3, 4, 5 and 10 days after germination. Roots were removed from 10-day plantlets.

RNA isolation, RT-PCR and Gel-Blot Analysis

Total RNA was isolated from a pool of plants, flowers or cotyledons according to (Douet *et al.,* 2009). For siliques and seeds, total RNA was purified according to (Vicient and Delseny 1999).

Aliquot of 2 µg of total RNA was treated with DNase RQ1 kit (Promega) and 100 ng of DNase-treated total RNA was used as input in semi-quantitative RT-PCR reactions using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). Controls were performed without reverse transcription step to detect contaminating DNA. ES and EI TFIIIA transcripts were amplified using primers a (5'-CTCACTTGAAGCAGCATATGC-3') and b (5'-TCCTGATGCTTTTGAAGCTGTG-3'). EI transcript was amplified with primers c (5'-GCGAGGCTACATGTTATGG-3') and d (5'-CAGGCATGACTCTCTTTCG-3').

For an internal control, actin was amplified using primers ACT2F (5'-CCTTGTACGCCAGTGGTCG-3') and ACT2R (5'-CTCGGCCTTGGAGATCCAC-3'). Amplification conditions: 50°C for 30min (reverse transcription step); 95°C for 15min (reverse transcription inactivation step); 29 (ES, EI), 35 (EI) or 26 (ACT2) cycles

CONFIDENTIAL

(95°C for 30s, 58°C (ES, EI) or 53°C (ACT2 and EI) for 30s, 72°C for 1min); 72°C for 10min.

For RNA gel blot analyses, 2 μg of total RNA per lane was fractionated on 1% agarose/1,9% formaldehyde gels and capillary blotted onto Hybond-N membranes (GE Healthcare Biosciences).

DNA probes were labeled with [α-^{32}P] dCTP using a random hexamer priming method (Megaprime DNA labelling system, Amersham). For quantification a phosphoimager (Molecular Imager FX; Bio-Rad) and Quantity One were used.

DNA constructs

The *TFIIIA* gene consists of 7 exons, the third of which is alternatively skipped, and 6 introns. For *TFIIIA* gene complementation, the coding sequence together with 739 pb upstream from the ATG and 242 bp downstream from the stop codon were amplified by PCR from genomic DNA, and confirmed by sequencing after cloning in a pCambia plasmid. The ES-construct is a chimeric genomic/cDNA construct. It is identical to the previous one except that exons 2 and 4 were amplified from a TFIIIA ES cDNA. The EI-construct is a chimeric genomic/cDNA construct. It is identical to the gene construct except that exons 2, 3 and 4 were amplified from a TFIIIA EI cDNA. ES and EI constructs were confirmed by sequencing after cloning in a pCambia plasmid. For these three constructs, plant transformation was performed with *Agrobacterium tumefaciens* in plants heterozygous for the *TFIIIA* gene mutation (SALK_008626).

Purification of recombinant GST-TFIIIA protein and GST-ΔN-TFIIIA protein

The GST-TFIIIA protein was purified as described in (Mathieu *et al.,* 2003b).

CONFIDENTIAL

The coding sequence of ΔN-TFIIIA protein (zinc fingers 3 to 9) was amplified using primers 5'-ATCATAGGATCCTGTTTGAGAGATCTTTTAC-3' and 5'-ATTACAGGATCCCTAGCAAGTTTCGTG-3' containing a *BamH1* restriction site (underlined). After PCR amplification and *BamH1* digestion, the coding sequence of ΔN-TFIIIA protein was cloned into the pGEX-5X-1 expression vector (Amersham Biosciences). In the resulting construct, ΔN-TFIIIA is fused to the C-terminal end of the GST. Prior to expression in bacteria, sequencing was performed to verify the sequence of the cDNA and the translational fusion.

To express the GST-ΔN-TFIIIA recombinant protein, pGEX-ΔN-TFIIIA was transformed into *E. coli* BLR (DE3) cells. A fresh 2 ml starter culture of BLR (DE3)/pGEX-ΔN-TFIIIA was used to inoculate 200 ml of LB containing 100 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracyclin. The culture was grown at 37°C to an OD_{600} of 0.3 to 0.4. Recombinant protein expression was then induced by addition of 1 mM IPTG followed by an incubation of 2-3 hrs at 30°C. Induction was verified by SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue-staining. Induced cells were harvested by centrifugation at 4,000xg for 15 min at 4°C, and resuspended in 1 ml of ice-cold buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl). Cell lysis was performed by addition of 100 µg/ml lysozyme, followed by a 15 min incubation at 30°C and sonication. Soluble cell extract containing GST-ΔN-TFIIIA was recovered by centrifugation at 12,000xg at 4°C for 30 min and saved at 4°C for purification.

The extracts containing the recombinant protein or GST were mixed with glutathione agarose (Sigma) for 30 min at room temperature and unbound protein was removed by three washes in 1M NaCl and three washes in 1X PBS. Subsequently, bound protein was removed by elution with 10 mM reduced glutathion pH 7.6 (Sigma). Eluates were analyzed by SDS-PAGE.

CONFIDENTIAL

***In vitro* transcription**

In vitro transcription reactions using tobacco nuclear extracts were performed as previously described (Yukawa *et al.,* 1997) with minor modifications. Briefly, reaction was performed in a 20µL volume containing 30 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 3 mM MgSO4, 80 mM KOAc, 0.1 mM EGTA, 2mM DTT, 10% glycerol, 0.5 mM each of ATP, CTP, UTP, 25 µM GTP, 37 kBq [^{32}P]GTP, 0.8 pmol circular plasmids, 0.5 µg.mL^{-1} amanitin, and ca. 15 µg tobacco nuclear extract. After inoculation at 28°C for the indicated time, the ^{32}P-labeled RNA was extracted by phenolation or Total RNA SafeKit (BIO101). The extracted RNA was separated by 5–8% polyacrylamide gel containing 7 M urea and TBE. Radioactivity was detected by Bio-Imaging Analyser BAS-2000 II (Fuji Photo Film).

Protein extraction and western blot analysis

Total protein extracts were prepared as following. A pool of cotyledons, plantlets or flowers was ground in ice-cold extraction buffer (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 20 % glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2% NP40, protease inhibitor (Sigma)). Samples were then centrifuged 30 min at 16,000g, 4°C. Protein concentration of the supernatant was quantified using Bradford assay (Bio-Rad). Siliques and seeds were ground in liquid nitrogen before addition of the ice-cold extraction buffer.

SDS-PAGE and western blots were performed according to standard procedures. 40 µg of total protein extracts were loaded per well. Western blots were probed using polyclonal antibody Ac17 (1/1,000 dilution) or Ac16 (1/2,000 dilution). After incubation with a horseradish peroxydase-coupled anti-rabbit secondary antibody (1/10,000), immunoblots were developed by using the ECL Plus Western Blotting detection

CONFIDENTIAL

reagents (GE Healthcare Bio-Sciences). Equal loading of protein were confirmed by reprobing membrane with a mouse monoclonal anti-actin (Sigma 1/2,000 dilution), revealed with a horseradish peroxydase-coupled anti-mouse secondary antibody (Sigma 1/10,000 dilution).

Rabbit polyclonal antibodies Ab17, against C-terminal peptide sequence (CGDFVETDEDFTSRPR) between positions 278 and 293 of the TFIIIA protein sequence and Ab16, against central petptide sequence (CKGDDDKEKSGSGG) between positions 169 and 182 were customer made by Eurogentec (Angers, France). For quantification Quantity One was used.

Stastistics

Statistical analyses of 5S rRNA amounts and TFIIIA transcripts levels were performed using the non-parametric Mann-Whitney U-test with mean value comparison.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Probst for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, the Blaise Pascal University, the INSERM, the Auvergne University, a grant from the French Ministry of Research (ACI BCMS 04-5486), from the INCA (Institut National du Cancer, Réseau Epipro) and from the Auvergne region. E.L. was supported by a graduate studentship from the French Ministry of Research.

CONFIDENTIAL

Figure S1: ES and EI-constructs are chimeric genomic/cDNA constructs

The coding sequence together with 739 pb upstream from the ATG (promoter: P) and 242 bp downstream from the stop codon were amplified by PCR from genomic DNA (Figure 1A TFIIIA gene). For EI-contruct the genomic region between exons 2 to 4 (exon 3 is the alternative one, black box) was replaced by exons 2, 3 and 4 amplified from a TFIIIA EI cDNA. For ES-construct, it was replaced by exons 2 and 4 amplified from a TFIIIA ES cDNA; the alternative exon is therefore absent. Each contruct expresses only one transcript isoform.

Figure S2: 5S rRNA accumulation correlates with cotyledons weight increase

From day 4 post-germination, the 5S rRNA levels increase (figure 4D) correlating with an accelerated increase of cotyledons weight. Six pools of 8 cotyledons were weighed for each stage.

Figure S3: TFIIIA proteins amounts in WT and ES-plants 10 day-seedlings.

Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection of actin was used for normalization. Protein amounts relative to actin as obtained from 8 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. a.u.: arbitrary units.

Figure S4: 25S rRNA follows the accumulation pattern of 5S rRNA in post-germination and reproductive phases.

Total RNA from flowers, fresh and old siliques and mature seeds (A) and from cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination (B) was hybridized using a 25S

CONFIDENTIAL

rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclear protein (RAN) probe. The 25S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 4 to 6 independent experiments are represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar.

CONFIDENTIAL

REFERENCES

Allison, L.A., North, M.T. and Neville, L.A. (1995) Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIIA and ribosomal protein L5 in Xenopus oocytes: specialization for storage versus mobilization. *Dev Biol*, **168**, 284-295.

Bieker, J.J., Martin, P.L. and Roeder, R.G. (1985) Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell*, **40**, 119-127.

Camier, S., Dechampesme, A.M. and Sentenac, A. (1995) The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9338-9342.

Douet, J., Blanchard, B., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2008) Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1783-1791.

Douet, J. and Tourmente, S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in Arabidopsis thaliana and Xenopus laevis. *Heredity*, **99**, 5-13.

Douet, J., Tutois, S. and Tourmente, S. (2009) A Pol V-mediated silencing, independent of RNA-directed DNA methylation, applies to 5S rDNA. *PLoS Genet*, **5**, e1000690.

Fan, H. and Sugiura, M. (1995) A plant basal in vitro system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive rbcS gene. *Embo J*, **14**, 1024-1031.

Fu, Y., Bannach, O., Chen, H., Teune, J.H., Schmitz, A., Steger, G., Xiong, L. and Barbazuk, B. (2009) Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA. *Genome Res*.

Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G. (1984) Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, **39**, 479-489.

Guddat, U., Bakken, A.H. and Pieler, T. (1990) Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. *Cell*, **60**, 619-628.

Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E. and Nagy, F. (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in Arabidopsis. *Plant J*, **11**, 93-103.

Hammond, M.C., Wachter, A. and Breaker, R.R. (2009) A plant 5S ribosomal RNA mimic regulates alternative splicing of transcription factor IIIA pre-mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 541-549.

Kmiec, E.B. and Worcel, A. (1986) The positive transcription factor of the 5S RNA gene proteolyses during direct exchange between 5S DNA sites. *J Cell Biol*, **103**, 673-681.

Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. and Chedin, S. (2006) The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev*, **20**, 2030-2040.

Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. and Tourmente, S. (2003a) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 2929-2939.

SUBMITTED MANUSCRIPT

Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., Vaillant, I., Sugiura, M. and Tourmente, S. (2003b) Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2424-2433.

Pittman, R.H., Andrews, M.T. and Setzer, D.R. (1999) A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *J Biol Chem*, **274**, 33198-33201.

Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S. and Saez-Vasquez, J. (2010) Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet*, **6**, e1001225.

Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M. and Saez-Vasquez, J. (2007) Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell*, **18**, 369-379.

Setzer, D.R. and Brown, D.D. (1985) Formation and stability of the 5 S RNA transcription complex. *J Biol Chem*, **260**, 2483-2492.

Srivastava, M. and Pollard, H.B. (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*, **13**, 1911-1922.

Tan-Wilson, A.L. and Wilson, K.A. (2011) Mobilization of seed protein reserves. *Physiol Plant*.

Tuteja, R. and Tuteja, N. (1998) Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **33**, 407-436.

Vicient, C.M. and Delseny, M. (1999) Isolation of total RNA from Arabidopsis thaliana seeds. *Anal Biochem*, **268**, 412-413.

Wolffe, A.P. (1994) The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5 S RNA gene regulation. *J Cell Sci*, **107 (Pt 8)**, 2055-2063.

Wolffe, A.P. and Brown, D.D. (1988) Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science*, **241**, 1626-1632.

Yang, Z. and Hayes, J.J. (2003) Xenopus transcription factor IIIA and the 5S nucleosome: development of a useful in vitro system. *Biochem Cell Biol*, **81**, 177-184.

Yoine, M., Ohto, M.A., Onai, K., Mita, S. and Nakamura, K. (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J*, **47**, 49-62.

Yukawa, Y., Sugita, M. and Sugiura, M. (1997) Efficient in vitro transcription of plant nuclear tRNA(Ser) genes in a nuclear extract from tobacco cultured cells. *Plant J*, **12**, 965-970.

SUBMITTED MANUSCRIPT

LEGENDS

Figure 1: Post-transcriptional regulation of TFIIIA during development

A) The alternative exon (black box) is skipped in ES (exon-skipping) transcripts but included in EI (exon-inclusion) transcripts. ATG start codon and PTC (premature translational termination codon) are indicated. Primers (a and b) used for RT-PCR and size of amplicons is given.

B) RT-PCR detection of EI and ES transcripts in cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Expression of *ACTIN 2* was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT) (top). The ES and EI values relative to actin as obtained from 4 independent experiments are represented in the histogram (bottom). The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The ES/EI ratios are indicated below. a.u.: arbitrary units.

C) Quantification of the ES and EI transcripts in flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Expression of *ACTIN 2* was used for normalization. The ES and EI values relative to actin as obtained from 4 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The ES/EI ratios are indicated below. a.u.: arbitrary units. The significant differences (Mann-Whitney U-test, * P <0.05) are indicated.

D) EI transcript only is detected in mature seeds.

Figure 2: ES-plants have same 5S rRNA amounts than WT plants

A) Schematic representation of the *TFIIIA* gene with 6 exons (grey boxes) and one alternative exon (black box). The T-DNA (white triangle), in line SALK_008626, is inserted in the fifth exon. Primers used for RT-PCR are indicated.

CONFIDENTIAL

B) ES mRNA expression in ES-plants and WT 10 day-seedlings. Primers a and b were used for RT-PCR. Expression of *ACTIN 2* was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT). The expression of ES relative to actin as obtained from 8 independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar.

C) Full length EI endogenous transcripts are absent in ES-plants. Primers c and d were used for RT-PCR. Expression of *ACTIN 2* was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT).

D) 5S rRNA amounts from ES-plants and WT 10 day-seedlings. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclearprotein (RAN) probe (Haizel *et al.,* 1997). The ethidium bromide (EtBr) profile is shown. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. a.u.: arbitrary units.

Figure 3: TFIIIA protein is cleaved

A) Schematic representation of the full-length TFIIIA protein containing 9 zinc fingers (grey boxes) with the position of the peptides used to generate antibodies, from amino acids 169 to 182 for antibody 16 and from amino acids 278 to 293 for antibody 17.

B, C) TFIIIA protein isoforms are specifically revealed with both antibodies. Whole protein extract from 10 day-seedlings was fractionated on a 10% SDS PAGE. B) After transfer the line was cut in two parts, each half detected with antibody 16 or 17. Detection of actin was used for normalization. C) Antibody 17 was preincubated with

CONFIDENTIAL

a GST protein or with increasing concentrations of a TFIIIA-GST recombinant protein before revelation. The first line represents the control without preincubation.

D) A TFIIIA protein lacking the N-ter extremity does not stimulate 5S rRNA *in vitro* transcription. *In vitro* transcription assays were performed without recombinant protein (*) or with increasing concentrations (2.5, 5, 7 ng/µl) of GST-ΔN-TFIIIA or GST. As a control, a reaction with GST-TFIIIA was performed. Endogenous tRNA are shown.

Figure 4: The amount of TFIIIA and TFIIIA-C proteins vary during development

A) Western blot analyses of TFIIIA and TFIIIA-C in flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection of actin was used for normalization (top). The protein accumulation relative to actin as obtained from 5 independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar (bottom).

B) 5S rRNA amounts from flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclear protein (RAN) probe. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The significant differences (Mann-Whitney U-test, * $P < 0.05$) are indicated.

C) Western blot analyses of TFIIIA and TFIIIA-C in cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection of actin was used for normalization (top). The protein accumulation relative to actin as obtained from 5

CONFIDENTIAL

independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar (bottom).

D) 5S rRNA amounts from cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe (top). RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclearprotein (RAN) probe. The ethidium bromide (EtBr) profile is shown. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram (bottom). a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. Asterisks denote significant differences to the 4 day value **(**Mann-Whitney U-test, ** P <0.01**)**.

Figure 5: ES amount and TFIIIA cleavage contribute to the functional TFIIIA accumulation during the plant development.

Schematic representation of expression patterns of the ES transcripts (blue), the total amount of TFIIIA protein (TFIIIA and TFIIIA-C) (red) and the proportion of full-length TFIIIA protein (pink) and TFIIIA-C cleaved isoform (light pink), during seed maturation (fresh and old siliques and seeds) and the first days of development (3, 4, 5 and 10d). 5S rRNA accumulation is show in purple (bottom).

CONFIDENTIAL

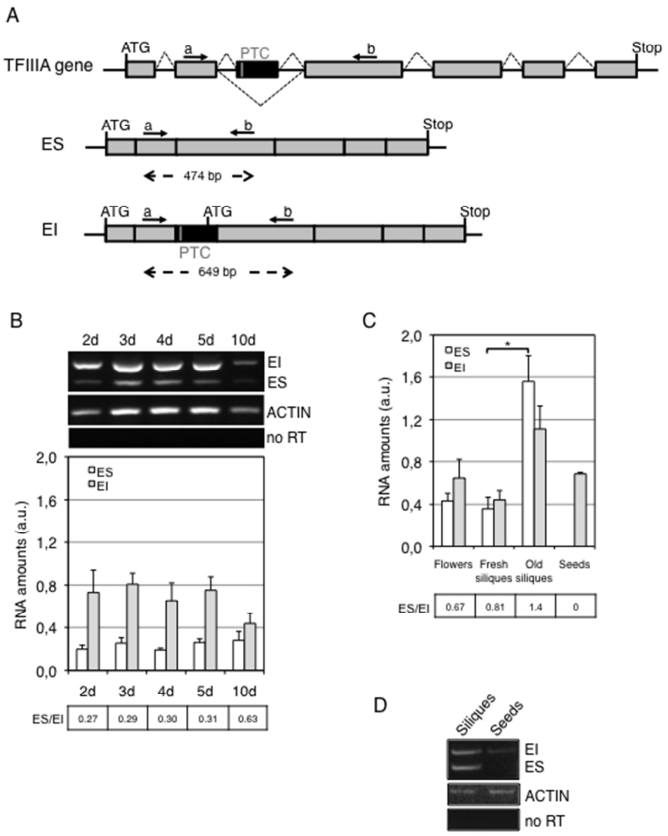


Figure 1: Post-transcriptional regulation of TFIIIA during development
A) The alternative exon (black box) is skipped in ES (exon-skipping) transcripts but included in EI (exon-inclusion) transcripts. ATG start codon and PTC (premature translational termination codon) are indicated. Primers (a and b) used for RT-PCR and size of amplicons is given.
B) RT-PCR detection of EI and ES transcripts in cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Expression of ACTIN 2 was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT) (top). The ES and EI values relative to actin as obtained from 4 independent experiments are represented in the histogram (bottom). The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The ES/EI ratios are indicated below. a.u.: arbitrary units.
C) Quantification of the ES and EI transcripts in flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Expression of ACTIN 2 was used for normalization. The ES and EI values relative to actin as obtained from 4 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The ES/EI ratios are indicated below. a.u.: arbitrary units. The significant differences (Mann-

Whitney U-test, * P <0.05) are indicated.
D) EI transcript only is detected in mature seeds.

190x254mm (72 x 72 DPI)

CONFIDENTIAL

Figure 2

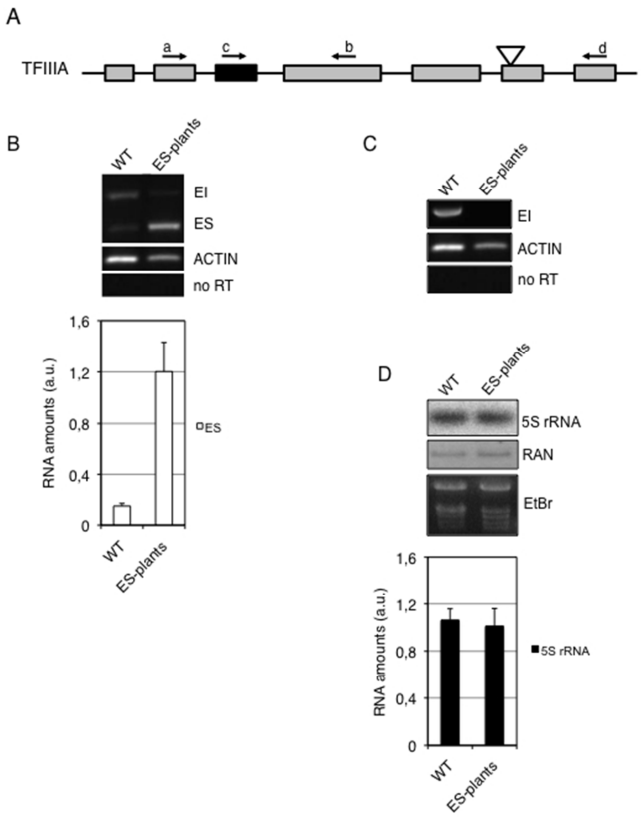


Figure 2: ES-plants have same 5S rRNA amounts than WT plants
A) Schematic representation of the TFIIIA gene with 6 exons (grey boxes) and one alternative exon (black box). The T-DNA (white triangle), in line SALK_008626, is inserted in the fifth exon. Primers used for RT-PCR are indicated.
B) ES mRNA expression in ES-plants and WT 10 day-seedlings. Primers a and b were used for RT-PCR. Expression of ACTIN 2 was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT). The expression of ES relative to actin as obtained from 8 independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar.
C) Full length EI endogenous transcripts are absent in ES-plants. Primers c and d were used for RT-PCR. Expression of ACTIN 2 was used for normalization. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT).
D) 5S rRNA amounts from ES-plants and WT 10 day-seedlings. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA

probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclearprotein (RAN) probe (Haizel et al., 1997). The ethidium bromide (EtBr) profile is shown. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. a.u.: arbitrary units.

190x254mm (72 x 72 DPI)

CONFIDENTIAL

Figure 3

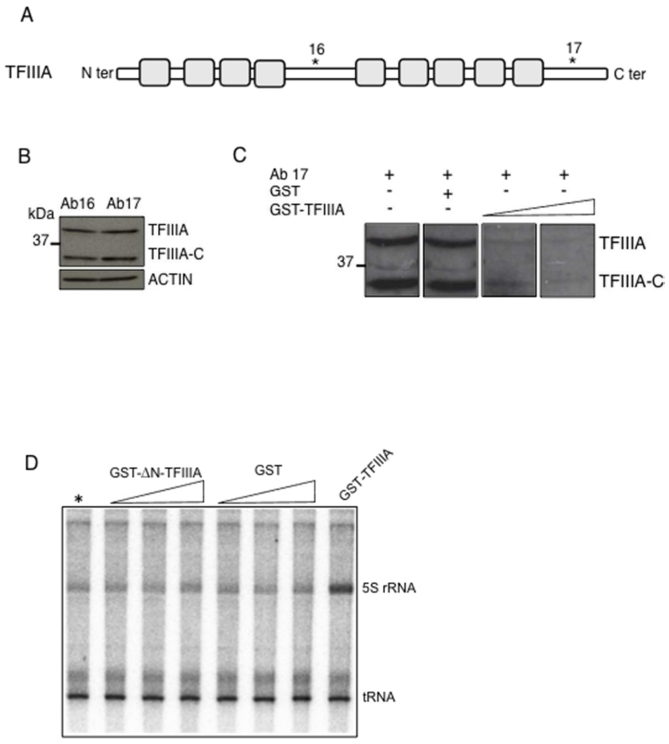


Figure 3: TFIIIA protein is cleaved
A) Schematic representation of the full-length TFIIIA protein containing 9 zinc fingers (grey boxes) with the position of the peptides used to generate antibodies, from amino acids 169 to 182 for antibody 16 and from amino acids 278 to 293 for antibody 17.
B, C) TFIIIA protein isoforms are specifically revealed with both antibodies. Whole protein extract from 10 day-seedlings was fractionated on a 10% SDS PAGE. B) After transfer the line was cut in two parts, each half detected with antibody 16 or 17. Detection of actin was used for normalization. C) Antibody 17 was preincubated with a GST protein or with increasing concentrations of a TFIIIA-GST recombinant protein before revelation. The first line represents the control without preincubation.
D) A TFIIIA protein lacking the N-ter extremity does not stimulate 5S rRNA in vitro transcription. In vitro transcription assays were performed without recombinant protein (*) or with increasing concentrations (2.5, 5, 7 ng/µl) of GST-ΔN-TFIIIA or GST. As a control, a reaction with GST-TFIIIA was performed. Endogenous tRNA are shown.

190x254mm (72 x 72 DPI)

CONFIDENTIAL

Figure 4

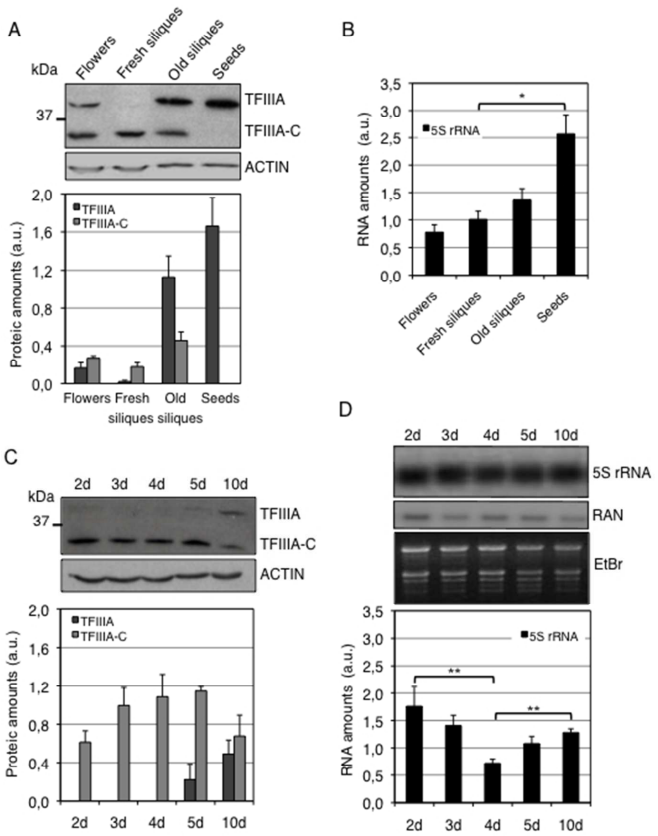


Figure 4: The amount of TFIIIA and TFIIIA-C proteins vary during development
A) Western blot analyses of TFIIIA and TFIIIA-C in flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection of actin was used for normalization (top). The protein accumulation relative to actin as obtained from 5 independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar (bottom).
B) 5S rRNA amounts from flowers, fresh and old siliques and mature seeds. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclear protein (RAN) probe. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. The significant differences (Mann-Whitney U-test, * $P < 0.05$) are indicated.
C) Western blot analyses of TFIIIA and TFIIIA-C in cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection

of actin was used for normalization (top). The protein accumulation relative to actin as obtained from 5 independent experiments is represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar (bottom).
D) 5S rRNA amounts from cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe (top). RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclearprotein (RAN) probe. The ethidium bromide (EtBr) profile is shown. The 5S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 5 independent experiments are represented in the histogram (bottom). a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. Asterisks denote significant differences to the 4 day value (Mann-Whitney U-test, ** P <0.01).

190x254mm (72 x 72 DPI)

CONFIDENTIAL

Figure 5

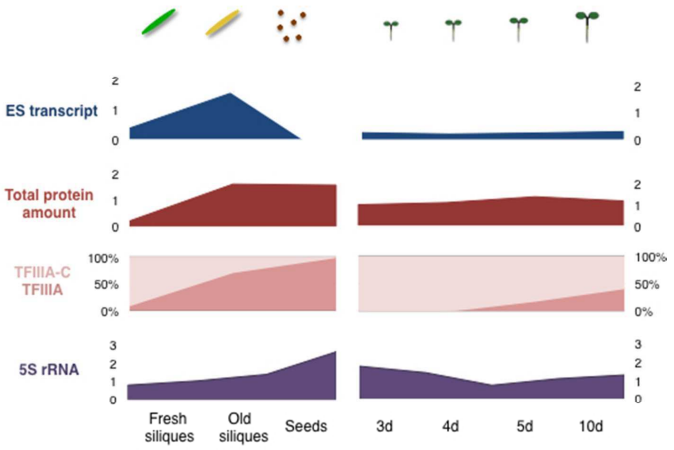


Figure 5: ES amount and TFIIIA cleavage contribute to the functional TFIIIA accumulation during the plant development.
Schematic representation of expression patterns of the ES transcripts (blue), the total amount of TFIIIA protein (TFIIIA and TFIIIA-C) (red) and the proportion of full-length TFIIIA protein (pink) and TFIIIA-C cleaved isoform (light pink), during seed maturation (fresh and old siliques and seeds) and the first days of development (3, 4, 5 and 10d). 5S rRNA accumulation is show in purple (bottom).

190x254mm (72 x 72 DPI)

Supplementary data 1

Figure S1: ES and EI-constructs are chimeric genomic/cDNA constructs
The coding sequence together with 739 pb upstream from the ATG (promoter: P) and 242 bp downstream from the stop codon were amplified by PCR from genomic DNA (Figure 1A TFIIIA gene). For EI-contruct the genomic region between exons 2 to 4 (exon 3 is the alternative one, black box) was replaced by exons 2, 3 and 4 amplified from a TFIIIA EI cDNA. For ES-construct, it was replaced by exons 2 and 4 amplified from a TFIIIA ES cDNA; the alternative exon is therefore absent. Each contruct expresses only one transcript isoform.

190x254mm (72 x 72 DPI)

Supplementary data 2

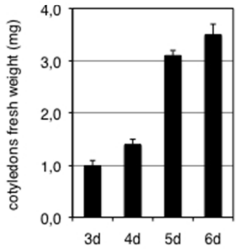


Figure S2: 5S rRNA accumulation correlates with cotyledons weight increase
From day 4 post-germination, the 5S rRNA levels increase (figure 4D) correlating with an accelerated increase of cotyledons weight. Six pools of 8 cotyledons were weighed for each stage.

190x254mm (72 x 72 DPI)

Supplementary data 3

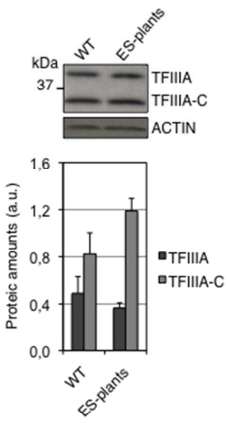


Figure S3: TFIIIA proteins amounts in WT and ES-plants 10 day-seedlings.
Whole protein extracts were fractionated on a 10% SDS PAGE before detection with antibody 17. Detection of actin was used for normalization. Protein amounts relative to actin as obtained from 8 independent experiments are represented in the histogram. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. a.u.: arbitrary units.

190x254mm (72 x 72 DPI)

Supplementary data 4

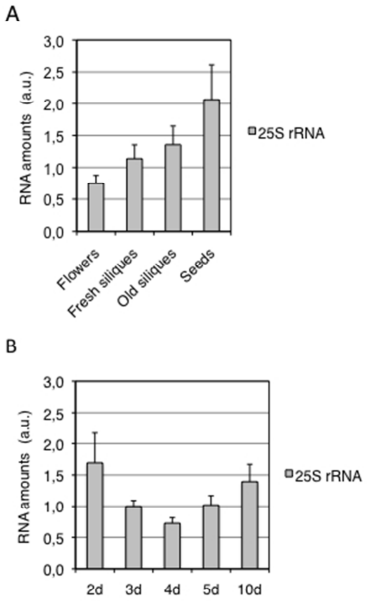


Figure S4: 25S rRNA follows the accumulation pattern of 5S rRNA in post-germination and reproductive phases.
Total RNA from flowers, fresh and old siliques and mature seeds (A) and from cotyledons at 2, 3, 4, 5 and 10 days post-germination (B) was hybridized using a 25S rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAS-related nuclear protein (RAN) probe. The 25S rRNA amounts relative to RAN as obtained from 4 to 6 independent experiments are represented in the histogram. a.u.: arbitrary units. The standard deviation of the mean is indicated on each bar.

190x254mm (72 x 72 DPI)

Résultats complémentaires

Dans l'étude rapportée dans l'article, nous avons mis en évidence qu'il existait, en plus d'une régulation post-transcriptionnelle du gène TFIIIA (l'épissage alternatif de son ARN prémessager), une régulation post-traductionnelle de la protéine TFIIIA. En effet, l'utilisation des deux anticorps Ac16 et Ac17 dirigés, respectivement, contre la partie centrale et la partie C-terminale de la protéine TFIIIA, a révélé l'existence de deux protéines : la première de 44 kDa qui correspond à la protéine TFIIIA pleine longueur, et la deuxième, de 34 kDa, qui correspond à une forme clivée de TFIIIA, que nous avons nommée TFIIIA-C et qui provient du clivage protéolytique de TFIIIA. La position des anticorps, notamment celle de l'Ac16, permet de supposer que ce clivage aurait lieu au niveau du doigt de zinc 3 et donc dans la partie N-terminale de TFIIIA. Des questions restent cependant posées, que nous aborderons dans cette partie Résultats complémentaires.

III. Mise en évidence d'une protéine correspondant à la partie N-terminale de TFIIIA

Bien que le clivage de la protéine TFIIIA ait été révélé, seule la partie C-terminale de ce clivage a pu être mis en évidence lors de notre étude. Or, si la forme TFIIIA-C du clivage est accumulée de façon stable dans la plante, qu'en est-il de la partie N-terminale ?

III.1. Utilisation d'un anticorps anti-TFIIIA N-terminal : Ac18

Nous avons utilisé un 3ème anticorps dirigé contre la partie N-terminale de TFIIIA : l'anticorps Ac18 (Figure 20). TFIIIA-C faisant 34 kDa et TFIIIA, 44 kDa, le poids moléculaire théorique attendu de cette partie N-terminale est d'environ 10 kDa. Les analyses protéiques ont été réalisées dans des conditions de migration appropriées (gel de polyacrylamide à 15%) permettant de visualiser des protéines de faible poids moléculaire. Les mêmes tissus que ceux testés pour les anticorps Ac16 et Ac17, c'est-à-dire, des cotylédons de 3, 5 et 10 jours après la germination ainsi que des fleurs, des siliques et des graines, ont été testés.

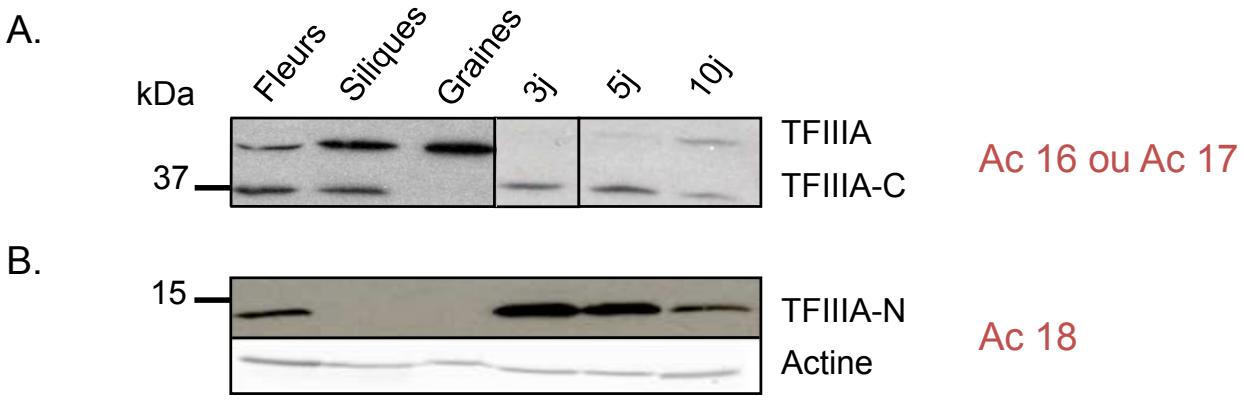


Figure 24 : L'a` ticorps 18 révèle u` e protéi` e qui suit le profil d'accumulatio` de TFIIIA-C.

A. Le western blot a été réalisé sur différents extraits protéiques et révélé avec l'anticorps Ac 17; l'anticorps Ac 16 révèle le même profil.

B. L'anticorps Ac 18 met en évidence une bande en dessous de 15 kDa qui suit le profil d'accumulation de TFIIIA-C, elle peut donc correspondre à la partie N-terminale du clivage protéolytique de TFIIIA. Cette bande est nommé TFIIIA-N. Cependant cette bande est toujours absente dans les siliques et les graines.

L'anticorps Ac18 a révélé une bande en dessous de 15 kDa (Figure 24). Cette bande que nous nommerons par la suite TFIIIA-N, semble suivre le profil d'accumulation de TFIIIA-C. En effet, de 3 à 5 jours après la germination, la quantité de TFIIIA-N est importante et constante. De plus, à 10 jours post-germination, cette quantité diminue fortement, comme c'est le cas pour TFIIIA-C. Ce profil est donc similaire à celui de TFIIIA-C observé dans les cotylédons.

Dans les tissus de la phase reproductive, la situation est différente. Alors que TFIIIA-C est retrouvée dans les fleurs et les siliques mais pas dans la graine, la bande détectée par l'anticorps Ac18 n'est présente que dans les fleurs. En effet, elle n'est jamais détectée dans les siliques.

Contrairement à l'existence de TFIIIA-C qui a été confirmée par l'utilisation de deux anticorps différents, détectant spécifiquement la même protéine, la protéine TFIIIA-N d'environ 13 kDa n'a été révélée que par le seul anticorps Ac18. Il s'avère que cet anticorps est peu spécifique dans la zone de détection de la protéine TFIIIA pleine longueur. En effet, nous n'avons pas pu détecter avec certitude la forme TFIIIA pleine longueur avec cet anticorps. Ce problème d'aspécificité de l'anticorps Ac18, ne nous permet pas de confirmer l'existence de la partie N-terminale de la protéine TFIIIA clivée. Toutefois, le poids moléculaire apparent de la protéine détectée est proche de celui attendu, les quantités importantes de cette protéine accumulées durant les premiers jours du développement ainsi que son absence dans la graine, sont autant d'arguments pour dire qu'elle pourrait correspondre à TFIIIA-N.

III.2. Etablissement de lignées transgéniques étiquetées permettant de confirmer le clivage

Afin de confirmer les résultats obtenus avec l'anticorps Ac18, c'est-à-dire l'existence de la partie N-terminale du clivage de TFIIIA, des lignées de surexpression de la protéine TFIIIA étiquetée en N-terminale ont été établies. L'ADNc de TFIIIA, ES, avec à son extrémité 5' une séquence codant pour une étiquette HA (HA), a été placé sous le contrôle du promoteur p35S (Annexe) et des plantes sauvages de l'écotype Columbia ont été transformées avec le vecteur pHA-TFIIIA. 15 plantes transformées en génération T1, 1ère génération de plantes après la transformation, ont été obtenues récemment. L'utilisation de

cette lignée devrait permettre de détecter la protéine TFIIIA pleine longueur ainsi que la partie N-terminale du clivage avec un anticorps dirigé contre l'étiquette. Les lignées avec une insertion mono-locus seront identifiées, et l'expression du transgène sera vérifiée par RT-PCR et par western blots sur des plantules de 10 jours.

Dans le même temps, où nous réalisions ces lignées transgéniques comportant une étiquette en 5' du transcrit ES, nous avons réalisé une deuxième lignée avec l'ADNc ES étiquetée en 3', à l'aide d'une séquence codant pour une étiquette Flag (Annexe). Cette construction a été nommée pTFIIIA-Flag. Comme pour la construction précédente, l'ADNc ES étiqueté a été cloné sous le contrôle d'un promoteur fort, p35S, afin de maximiser son expression. Les transformations de plantes d'écotype Columbia sauvage ont été réalisées. 30 plantes de la génération T1 ont déjà été récupérées. La stratégie d'analyse est la même que pour les lignées pHA-TFIIIA ; nous allons, après avoir vérifié en T1 l'expression du transgène, réaliser des western blots afin de détecter les protéines TFIIIA et TFIIIA-C avec un anticorps anti-Flag.

IV. La protéine TFIIIA est clivée au cours du développement

IV.1. Clivage de TFIIIA dans les premières heures du développement de la plantule

Les résultats obtenus dans l'équipe concernant la réorganisation de la chromatine d'ADNr 5S nous ont amenés à regarder le profil d'accumulation des protéines TFIIIA et TFIIIA-C de 2 à 5 et à 10 jours après la germination ainsi qu'au stade graine qui accumule des réserves importantes (Cf. Article). La différence majeure entre la graine et des cotylédons de 2 jours est la présence de TFIIIA en grande quantité dans la graine et son absence à 2 jours post-germination. De plus, la forme clivée TFIIIA-C est, quant à elle, absente dans la graine mais détectée dès 2 jours (Cf. Article). Il était donc intéressant de regarder les niveaux d'accumulation de ces deux formes et donc l'activité de clivage protéolytique de TFIIIA entre ces deux stades. Pour cela, le niveau d'expression de TFIIIA a été étudié sur des graines en germination ainsi que pour des plantules entières âgées de 1 jour.

Les résultats présentés sont issus de deux extractions protéiques indépendantes et nous permettent d'établir une tendance concernant le profil d'accumulation de ces

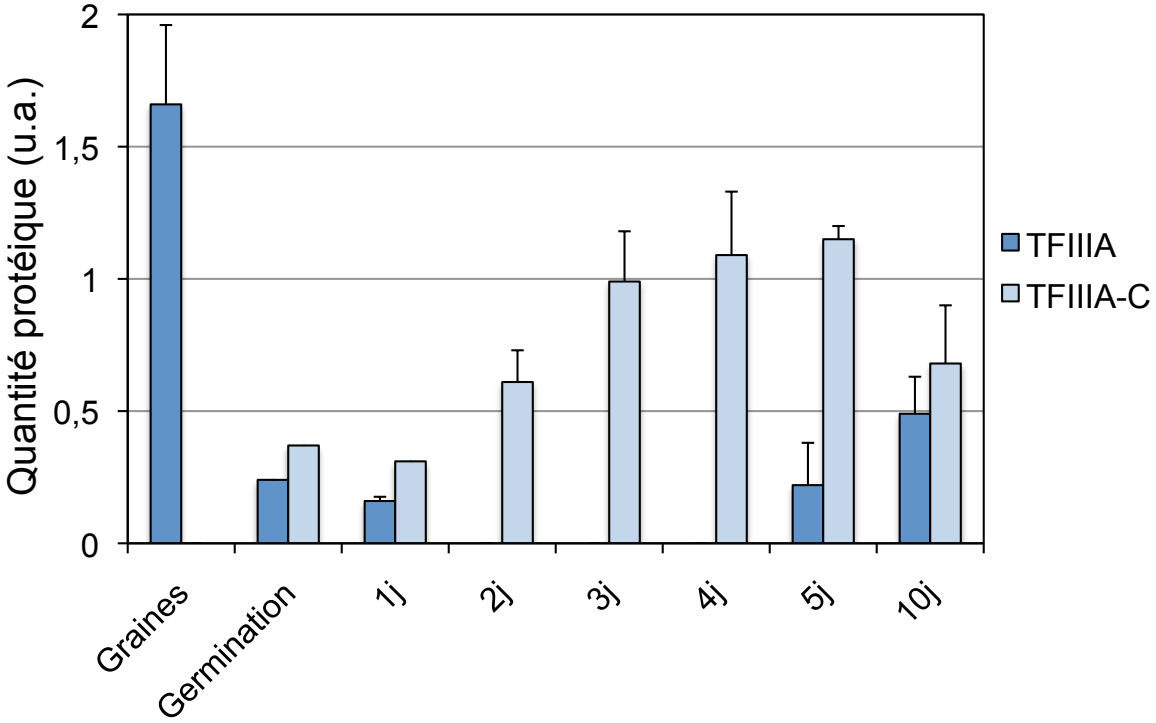


Figure 25 : La protéine TFIIIA accumulée dans la graine est dégradée dès la germination.
L'accumulation des formes TFIIIA et TFIIIA-C est indiquée depuis le stade graine jusqu'à 10 jours post-germination. La quantité de ces protéines après avoir été normalisée par les quantités d'actine, est donnée en unités arbitraires. (n=5, n=1 pour la germination, n=2 pour 1 jour)

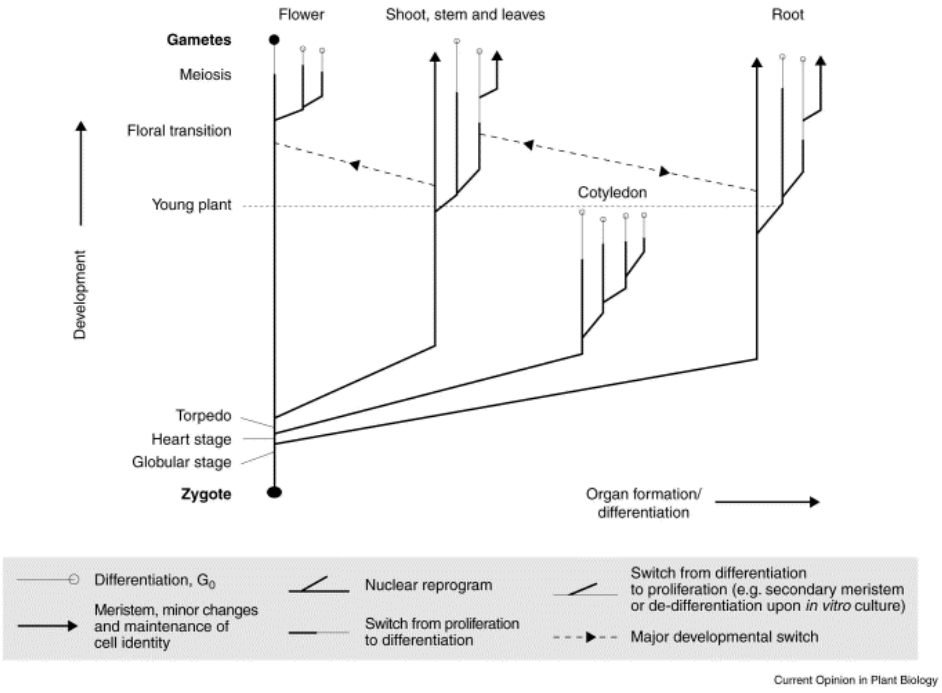


Figure 26 : Les cotylédons proviennent d'un lignage cellulaire différent de celui des feuilles.
(D'après Fransz PF et de Jong JH., 2002)

protéines à ces stades. La figure 25 montre que la quantité de TFIIIA chute entre le stade graine et la germination passant de 1,66 u.a. à 0,24 u.a.. La quantité de TFIIIA continue alors de diminuer afin d'atteindre 0 ,16 u.a. à 1 jour jusqu'à n'être plus détectée à 2 jours post-germination. La forme clivée TFIIIA-C, quant à elle, apparaît dès le stade germination alors qu'elle est absente dans la graine. Dès la germination de la graine, il y a donc reprise du clivage de la protéine TFIIIA pleine longueur. Cependant, les quantités de TFIIIA-C observées à ces stades semblent relativement faibles pour que le clivage justifie, à lui seul, la forte diminution de TFIIIA entre le stade graine et la germination. Il est donc possible qu'une grande majorité du pool de protéines TFIIIA accumulées dans la graine soit directement dégradée dès la germination sans passer par une étape de clivage protéolytique. L'état transcriptionnel du gène TFIIIA n'est pas connu à ces stades.

Notre hypothèse concernant cette forte dégradation de la protéine TFIIIA dans les toutes premières heures du développement repose sur le fait que les protéines TFIIIA présentes dans la graine ne sont pas là pour transcrire des ARNr 5S au début du développement mais qu'elles ont servi à transcrire des ARNr 5S accumulés dans la graine et/ou à les lier pour leur stockage (Cf. Discussion et Perspectives).

IV.2. Clivage de TFIIIA dans la première paire de feuilles

Nous avons cherché à savoir si l'apparition de la forme pleine longueur de TFIIIA au 5ème jour était caractéristique des seuls cotylédons, ou si au contraire elle pouvait être retrouvée plus largement dans d'autres tissus en formation. L'expression protéique a ainsi été étudiée dans les premiers tissus à se former après les cotylédons c'est-à-dire la première paire de feuilles. Il est important de noter que les cotylédons étant les premiers tissus chlorophylliens à émerger, ils possèdent des fonctions et des caractéristiques phénotypiques qui leur sont propres. De plus, les cotylédons proviennent d'un lignage cellulaire différent de celui des feuilles (Soppe *et al.* 2002) (Figure 26). Ainsi même si les cotylédons et la première paire de feuilles sont des tissus en formation, ils n'auront pas forcément un profil similaire d'accumulation de TFIIIA.

Nous avons donc réalisé des western blots avec des extraits protéiques obtenus à partir de feuilles âgées de 2 à 5 jours et 10 jours après leur émergence. Comme pour

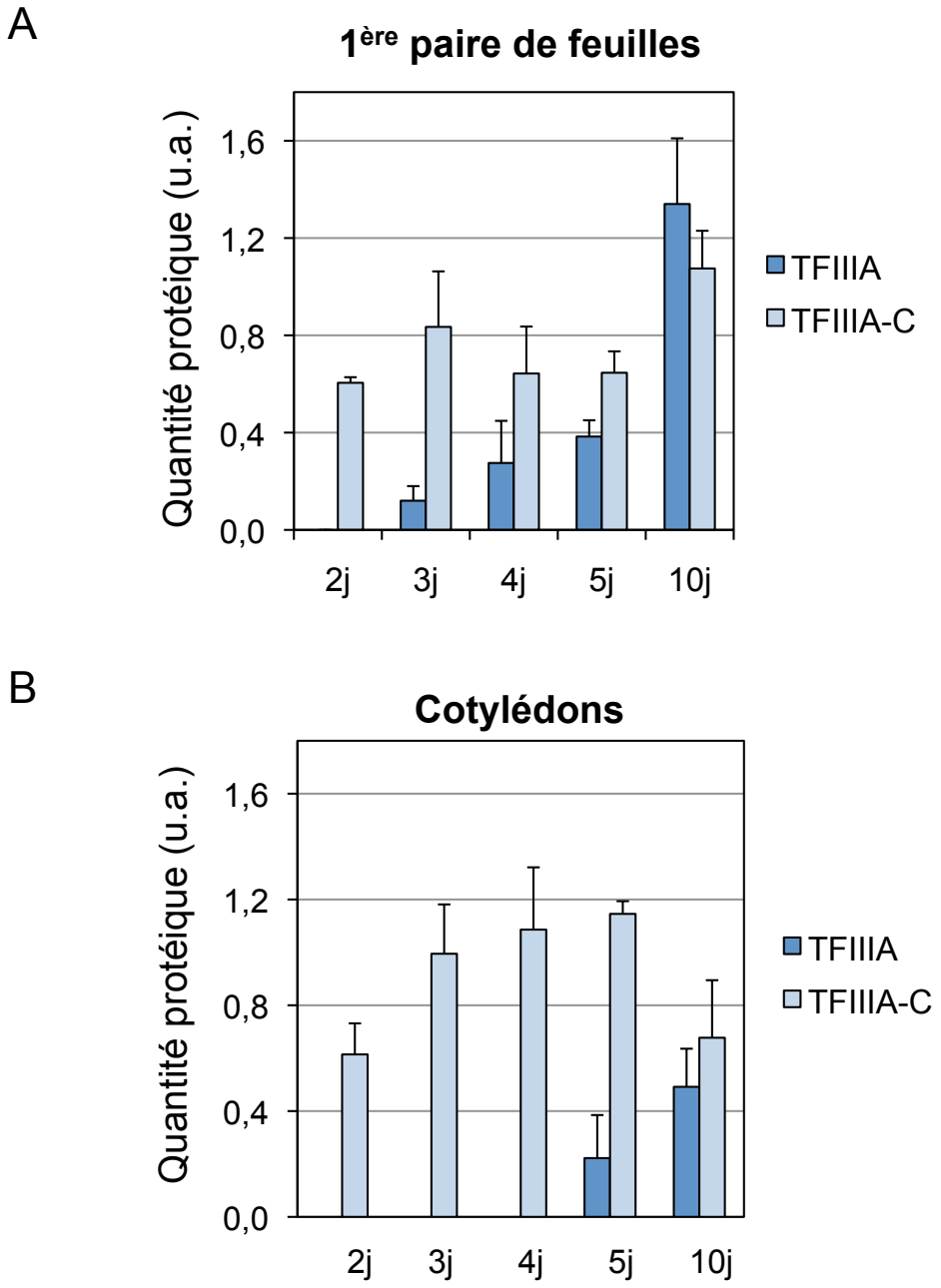


Figure 27 : L'accumulation des protéines TFIIIA et TFIIIA-C présente un profil similaire dans la 1ère paire de feuilles et les cotylédons.

A. Graphique représentant l'accumulation des formes TFIIIA et TFIIIA-C dans la première paire de feuilles. (n=3-5)

B. Graphique représentant l'accumulation des formes TFIIIA et TFIIIA-C dans les cotylédons. (n=5)

La quantité de ces protéines après avoir été normalisée par les quantités d'actine, est donnée en unités arbitraires

l'analyse menée sur les cotylédons, l'anticorps Ac17 et l'anticorps anti-actine ont été utilisés. L'actine nous a servi à normaliser les résultats après quantification.

Un profil similaire à celui des cotylédons est observé dans la première paire de feuilles (Figure 27). En effet, dès le 2ème jour après l'émergence des feuilles, seule la forme clivée, TFIIIA-C, est présente. Le clivage protéolytique de TFIIIA est donc total dans des feuilles de 2 jours comme dans des cotylédons du même âge. La protéine TFIIIA pleine longueur, quant à elle, est détectée dès le 3ème jour. Dans les cotylédons, TFIIIA n'apparaît qu'au 5ème jour après la germination. Dans la première paire de feuilles comme dans les cotylédons, le taux de clivage va ensuite diminuer progressivement. En effet, à 10 jours, le clivage est d'environ 50% dans les cotylédons et dans la première paire de feuilles, TFIIIA et TFIIIA-C sont retrouvées en quantité équivalente. Les quantités de TFIIIA dans ces tissus augmentent progressivement pour passer de 0,12 u.a. à 1,34 u.a. de 3 à 10 jours après l'émergence des feuilles. Nous pouvons cependant noter que la quantité de TFIIIA à 10 jours est plus importante dans la première paire de feuille que dans les cotylédons (0,49 u.a. contre 1,34 u.a.).

Malgré les quelques différences observées, le profil d'accumulation de TFIIIA et TFIIIA-C est comparable dans les cotylédons et la première paire de feuilles : TFIIIA n'est pas présent dès l'apparition du tissu et l'activité de clivage de TFIIIA diminue au cours du développement de ce dernier. Il semblerait donc que ce profil ne soit pas seulement une caractéristique des cotylédons mais de façon plus générale, une caractéristique des tissus jeunes en formation ou tout du moins des cotylédons et des feuilles.

V. Le protéasome 26S n'intervient pas dans le clivage de la protéine TFIIIA à 5 jours post-germination

Une étude globale réalisée sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'établir une liste de plusieurs protéines cibles de l'ubiquitination (MAOR *et al.* 2007). L'ubiquitination est une marque de dégradation protéique. Les protéines ubiquitinées sont reconnues par le protéoasome 26S puis dégradées. Les protéines listées dans cette étude sont donc des cibles potentielles de la voie de dégradation protéique « ubiquitine-protéasome 26S ». Nous

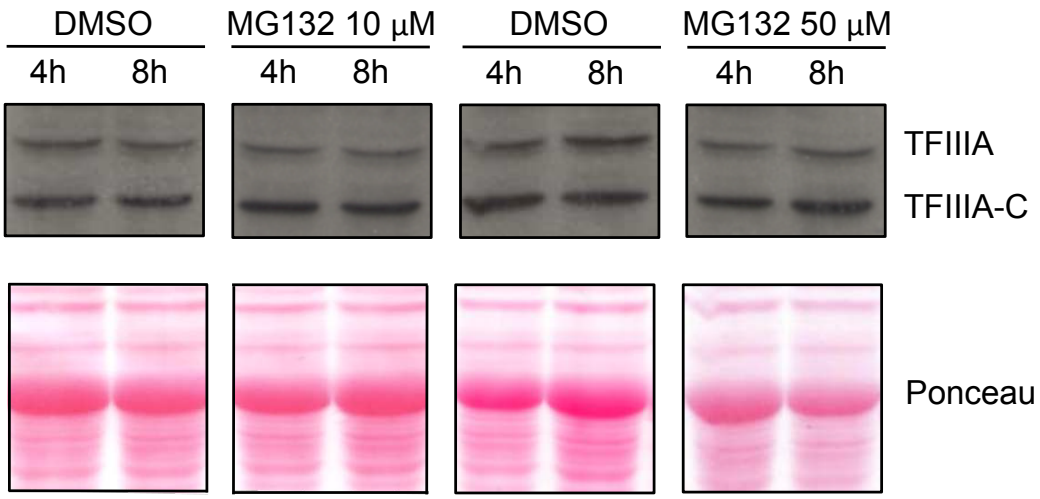


Figure 28 : La voie du protéasome 26S n'intervient pas dans la dégradation des formes TFIIIA et TFIIIA-C 5 jours après la germination.
Des plantules de 5 jours d'écotype Columbia ont été incubées en milieu liquide avec différentes concentrations de DMSO+MG132 (10 ou 50 µM) ou en présence de DMSO seul (contrôle), pendant 4 ou 8 heures. Les extraits protéiques réalisées à partir de ces plantules sont utilisés pour des western blots révélés avec l'anticorps Ac17. La coloration au ponceau de la membrane sert de contrôle de dépôt.

retrouvons le facteur de transcription TFIIIA dans cette liste. La forme clivée pourrait donc être un intermédiaire à la dégradation du facteur de transcription TFIIIA.

Afin de vérifier l'implication potentielle de la voie « ubiquitine-protéasome 26S » dans la régulation des taux de TFIIIA, des plantules de 5 jours ont été traitées avec du MG132, un inhibiteur de cette voie (Tsubuki *et al.* 1993). En effet, si cette voie de dégradation intervient et dégrade TFIIIA ou TFIIIA-C, les plantules traitées au MG132 devraient présenter une accumulation de TFIIIA ou TFIIIA-C beaucoup plus importante que des plantules non traitées. Des plantules de 5 jours ont été incubées en présence de MG132 ou en absence (DMSO seul) pendant 4 à 8h. Deux concentrations de MG132 ont été testées : 10 et 50 µM. Une fois les plantules récoltées, les protéines ont été extraites et un western blot révélé avec l'anticorps Ac17 a été réalisé.

Comme le montre le western blot de la figure 28, quelque soit le temps d'incubation (4 ou 8h) ou les concentrations en MG132 (10 ou 50 µM) aucune différence d'accumulation de la forme clivée ou de TFIIIA entre les plantules non traitées (DMSO seul) et traitées (DMSO+MG132) n'est observée. Il semble donc que, bien que TFIIIA soit une cible potentielle de l'ubiquitination, la voie « ubiquitine-protéasome 26S » n'intervient pas dans la dégradation d'une des deux formes de TFIIIA à ce stade de développement mais l'intervention de cette voie à un autre stade ne peut pas être exclue, comme par exemple à la germination (Cf. partie Discussion et Perspectives).

VI. Epissage alternatif du gène TFIIIA et adaptabilité à l'environnement

L'étude de la lignée mutante (TFIIIA -/- ; T-DNA/T-DNA) complémentée par ES (ES-plants), présentée dans l'article, a montré que la régulation de l'expression de TFIIIA via l'épissage alternatif n'est pas indispensable à la plante en conditions normales de croissance en laboratoire. En effet, les plantes complémentées par ES ne présentent pas de différences phénotypiques et accumulent des quantités de TFIIIA et d'ARNr 5S identiques à celle d'une plante sauvage.

Fu *et al.* (2009) ont montré que des lignées surexprimant le transcrit ES mais possédant toujours le gène endogène TFIIIA actif, bien que se comportant comme des plantes sauvages en conditions normales, sont plus sensibles que des plantes sauvages à différentes conditions de stress. Les auteurs ont donc fait l'hypothèse de l'importance de

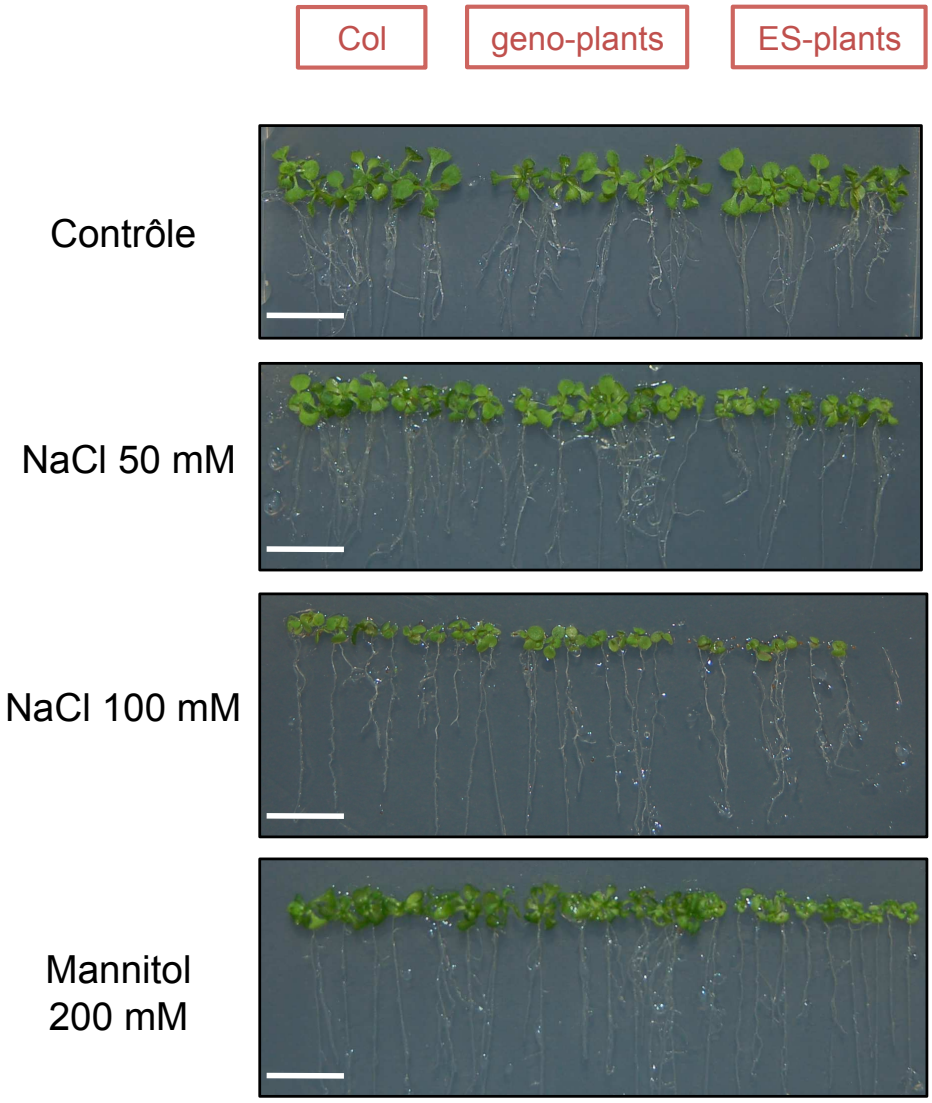


Figure 29 : Les plantes n'exprimant que le transcrit ES sont moins résistantes que des plantes sauvages.
Des graines d'Arabidopsis sauvage (Col), de la lignée complémentée ES-plants et de la lignée complémentée geno-plants ont été semées sur un milieu sans (contrôle) ou avec différents traitements (NaCl 50 mM ou 100 mM et mannitol 200 mM). Sur milieu NaCl 100 mM, certaines graines de la lignée ES-plants ne germent pas. Les plantes de la lignée geno-plants ne présentent pas de différences phénotypiques par rapport aux plantes sauvages.

l'épissage alternatif du gène TFIIIA dans la colonisation de l'environnement par les plantes. Or, nos lignées ES-plants surexpriment, elles aussi, le transcrit ES mais dans le cas présent, le gène TFIIIA est muté et seul le transcrit ES est accumulé de façon stable dans ces plantes. Afin de vérifier si ces lignées ES-plants sont également plus sensibles que des plantes sauvages en conditions de stress, des graines de la lignée ES-plants, de la lignée de complémentation par le gène TFIIIA (geno-plants) et de plantes sauvages ont été semées sur milieu MS supplémenté avec 50 ou 100mM de NaCl et sur milieu MS supplémenté avec 200mM de mannitol.

Comme nous pouvons le constater sur les photos de la figure 29, alors que les plantes de la lignée geno-plants se comportent comme des plantes sauvages face aux stress, les plantes de la lignée ES-plants, sont, elles, plus sensibles. Sur NaCl 100mM, 30% des graines de la lignée ES-plants ne germent pas. Il semble donc que l'absence de l'exon « 5S-like » perturbe l'adaptabilité de la plante. Le fait que la présence d'un exon « 5S-like » alternativement épissé dans le gène TFIIIIA soit une caractéristique propre aux plantes appuie l'hypothèse de son importance dans l'adaptabilité des plantes à leur environnement.

Des études ARN et protéiques de ces plantes stressées sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire.

Discussion et Perspectives

L'objectif de ma thèse était de caractériser l'expression de la protéine TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana*. Ces travaux ont été réalisés sur deux phases particulières du développement de la plante, où l'accumulation des ARNr 5S et donc celle de TFIIIA pouvaient varier. De façon surprenante, nous avons montré que la protéine TFIIIA était absente dans certains stades de développement alors qu'elle est le facteur de transcription de gènes indispensables à la vie de la plante. Nous avons également montré que cette protéine subissait un clivage protéolytique qui participe à la régulation du taux de TFIIIA dans la cellule en fonction des différents stades de développement. L'étude de l'accumulation des ARNr 5S dans les deux phases étudiées est en corrélation avec l'expression du transcrit ES et de celle de la protéine TFIIIA.

I. L'épissage alternatif du gène TFIIIA n'est pas indispensable à la vie de la plante

La particularité du gène TFIIIA chez *Arabidopsis thaliana* est de posséder un exon alternatif qui va être ou non épissé entraînant ainsi la production de deux transcrits : ES et EI. L'épissage alternatif est présent aussi bien chez les animaux où 95 % des pré-messagers subissent un épissage alternatif (PAN *et al.* 2008; WANG *et al.* 2008) que chez les plantes où environ 40 % des gènes produisent au moins deux transcrits (FILICHKIN *et al.* 2010; ZHANG *et al.* 2010). L'une des principales conséquences de l'épissage alternatif est la production de plusieurs transcrits et donc de plusieurs protéines à partir d'un seul gène et ainsi d'augmenter la diversité protéique. Cependant, dans le cas du gène TFIIIA, seul un des deux transcrits, ES, est traduit. L'épissage alternatif joue, dans ce cas, un rôle dans la régulation de l'expression du gène. En effet, au vu des résultats obtenus au cours de ma thèse et des travaux réalisés par d'autres équipes, nous savons que le transcrit ES, une fois traduit, donne la protéine TFIIIA et que le transcrit EI, lui, n'est pas productif et qu'il est la cible de la voie de dégradation NMD (FU *et al.* 2009; HAMMOND *et al.* 2009; YOINE *et al.* 2006). La voie NMD est une voie de dégradation d'ARNm considérés comme aberrants contenant un codon stop prémature ou PTC, comme c'est le cas pour le transcrit EI.

Une telle coordination de l'épissage alternatif et de la voie NMD pour réguler l'expression d'un gène a tout d'abord été mise en évidence chez les mammifères et

Caenorhabditis elegans. Ce mécanisme de régulation est nommé RUST (Regulated Unproductive Splicing and Translation) (LAREAU *et al.* 2007; LEWIS *et al.* 2003; NI *et al.* 2007). Il est notamment fortement impliqué dans la régulation de gènes codant pour des composants du ribosome (CUCCURESE *et al.* 2005; MITROVICH and ANDERSON 2000).

La présence d'un exon résultant de l'exonisation de l'ARNr 5S dans le gène TFIIIA et l'épissage alternatif de ce dernier n'existe que chez les plantes. La conservation de ce mécanisme qui est pourtant consommateur d'énergie, l'ARNm EI est transcrit pour être dégradé, laisse supposer de son importance dans la vie de la plante. Toutefois, bien qu'important, l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de TFIIIA n'est pas indispensable à la vie de la plante en laboratoire. En effet, nous avons montré que des plantes ne possédant pas de transcrit EI pleine longueur, car mutantes pour le gène TFIIIA, complémentées par une construction ne produisant que le transcrit ES, se comportaient comme des plantes sauvages en conditions normales de croissance en laboratoire. De la même façon, Fu *et al.* (2009) ont montré que des lignées surexprimant le transcrit ES se comportent comme des plantes sauvages en conditions normales. Dans nos plantes de la lignée ES-plants, aucune différence significative d'accumulation de la protéine TFIIIA ou des ARNr 5S n'est de plus observée par rapport à des plantes sauvages, alors qu'elles présentent une forte augmentation des transcrits ES. Cela montre que la plante peut vivre même en l'absence d'épissage alternatif du gène TFIIIA. Le clivage protéolytique de TFIIIA est légèrement augmenté dans ces plantes mais ne semble pas suffisant pour ajuster les quantités de TFIIIA dans ces plantes. Nous supposons qu'une régulation post-transcriptionnelle additionnelle se met en place. Par exemple, tous les transcrits ES accumulés dans ces plantes pourraient ne pas être traduits. Ceci peut se justifier par le fait que la plante n'a pas d'intérêt à avoir plus d'ARNr 5S disponibles si les autres composants du ribosome ne sont pas disponibles en quantité équivalente. Des études menées chez la levure montrent, en effet, que le maintien des quantités équimolaires des différents composants du ribosome serait sous le contrôle de l'ARN pol I et non pas de l'ARN pol III (LAFERTE *et al.* 2006; UPADHYA *et al.* 2002).

Ce comportement similaire des plantes ES et sauvages est observé en conditions normales de croissance en laboratoire mais pas en conditions de stress abiotiques. En effet, nous observons que les plantes mutantes pour TFIIIA complémentées par la forme ES seule

ne présentent pas la même résistance que des plantes sauvages ou des plantes complémentées par le gène TFIIIA complet, en conditions de stress salin ou osmotique. De façon similaire, Fu et *al.* ont montré que des plantes surexprimant ES et présentant des rapports ES/EI perturbés supportaient moins bien les stress que des plantes sauvages. Il semble donc que l'épissage alternatif du gène TFIIIA, et donc la production du transcrit EI, permette à la plante de s'adapter aux conditions de stress. Cet exon « 5S-like » dans le gène TFIIIA et le RUST qui permet sa régulation ne sont présents que chez les plantes et pourraient donc contribuer à leur adaptabilité à leur environnement. En effet, nous pouvons supposer que l'épissage alternatif et le RUST associé permettent l'adaptation aux stress, en modulant le rapport ES/EI.

Des expériences sur les effets des stress salins et osmotiques sur les lignées complémentées ES-plants et sur les plantes sauvages, sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire. L'épissage alternatif du gène TFIIIA, l'accumulation du transcrit ES ainsi que celle de la protéine TFIIIA seront étudiés dans ces plantes stressées.

II. Le clivage protéolytique régule les taux de la protéine TFIIIA dans la plante au cours du développement

II.1. Pendant la phase reproductive

Nous avons, dans un premier temps, étudié la protéine TFIIIA et les ARNr 5S durant la phase d'accumulation de réserves pendant le développement de la graine. Il s'avère que l'accumulation de la protéine TFIIIA dans les siliques et la graine est à la fois une conséquence de l'augmentation progressive de la quantité du transcrit ES et d'une diminution de l'activité de clivage protéolytique de cette protéine. Dans ces tissus, l'épissage alternatif est en faveur de la forme ES, son expression étant plus importante que celle de la forme EI dans des vieilles siliques. C'est d'ailleurs le seul tissu testé présentant un rapport ES/EI supérieur à 1. De plus, le clivage, très important dans les siliques jeunes, diminue fortement jusqu'à la fin de la phase reproductive puisque seule la forme TFIIIA pleine longueur est présente dans la graine.

L'expression des transcrits ES et EI ainsi que celle de la protéine TFIIIA dans un tissu tel que la fleur a été testé car il précède les siliques et donc la maturation de la graine. La différence importante d'accumulation de TFIIIA dans les fleurs par rapport aux siliques jeunes, où très peu de protéine TFIIIA est détectée, peut s'expliquer par le fait que ces deux tissus ont des fonctions différentes et ne présentent donc pas le même profil d'expression. En effet, la fleur contient les organes reproducteurs, c'est un tissu mature contrairement aux siliques jeunes qui contiennent des graines au début de leur maturation. L'accumulation des protéines que nous étudions dans les siliques, jeunes et vieilles, revient en fait à observer l'accumulation de TFIIIA et TIIIA-C dans des graines en cours de maturation.

Vu les taux importants de TFIIIA accumulés dans la graine, la présence de EI et l'absence de ES dans ce tissu peuvent paraître surprenantes. Cependant, les protéines et les ARNm observés à ce stade ne proviennent pas d'une transcription et d'une traduction dans la graine mature, dépourvue d'activité transcriptionnelle, mais de l'accumulation de ces protéines et ARNm au cours de la maturation de la graine. La présence du seul transcrit EI peut s'expliquer par un changement du profil d'épissage alternatif du gène TFIIIA lorsque les quantités de TFIIIA, et donc d'ARNr 5S, sont telles que les protéines L5 pourraient être dans leur totalité complexées aux ARNr 5S. Ainsi, selon le modèle établi par Hammond *et al.* (2009), les protéines L5 complexées ne pourraient plus lier l'exon alternatif « 5S-like » de l'ARN pré-messager TFIIIA favorisant le maintien de cet exon et la production de transcrit EI, en phase tardive de maturation de la graine.

II.2. De la germination à 2 jours

Dès la germination, les quantités importantes de TFIIIA accumulées dans la graine diminuent fortement et le clivage protéolytique reprend puisque la forme TFIIIA-C est de nouveau détectée. Cependant, le clivage, seul, ne peut expliquer la forte diminution de TFIIIA entre le stade graine et la germination. Les protéines TFIIIA seraient donc dégradées dès la germination. En effet, la graine imbibée présente une augmentation d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans plusieurs processus dont la dégradation protéique (HOLDSWORTH *et al.* 2008). Les protéines TFIIIA accumulées dans la graine ne semblent donc pas être là pour transcrire des gènes d'ARNr 5S après la germination mais ne seraient peut-être que le reflet de la transcription importante d'ARNr 5S qui vient d'avoir lieu. Nous

pouvons également supposer que les protéines TFIIIA participent au stockage des ARNr 5S dans la graine. En effet, notre équipe a démontré que TFIIIA lie l'ARNr 5S chez Arabidopsis (MATHIEU *et al.* 2003b). De même, dans l'ovocyte de xénope, où de grandes quantités d'ARNr 5S sont accumulées en prévision du développement futur de l'embryon, ces ARN stockés dans le cytoplasme sont complexés à la protéine TFIIIA (GINSBERG *et al.* 1984). Dans les premiers jours du développement, chez Arabidopsis, l'utilisation des ARNr 5S par la plantule pour son développement après la germination pourrait expliquer la dégradation des protéines TFIIIA qui leur étaient complexées.

La dégradation importante et rapide des protéines TFIIIA de la graine pourrait impliquer la voie ubiquitine/protéasome 26S. En effet, la voie de dégradation protéique « ubiquitine/protéasome 26S » est connue pour participer à la régulation de l'expression des gènes notamment en contrôlant les taux de leurs facteurs de transcription (BHAT and GREER 2011). Bien que l'action d'un inhibiteur de cette voie de dégradation, comme le MG312, n'ait pas eu d'effet sur l'accumulation des deux formes TFIIIA et TFIIIA-C dans des plantules de 5 jours, il est possible que cette voie joue un rôle lors de l'importante dégradation de TFIIIA au moment de la germination. Il serait donc intéressant de renouveler l'expérience de l'inhibition de la voie du protéasome 26S à ces stades de développement.

Cependant, pour que les protéines soient reconnues et dégradées par le protéasome 26S, elles doivent être polyubiquitinées (au moins 4 ubiquitines) et il a été démontré que la monoubiquitination permettait, entre autres, l'activation de facteurs de transcription (BHAT and GREER 2011). Or, l'étude menée par Maor *et al.* a été réalisée sur des suspensions de cellules d'Arabidopsis et le niveau d'ubiquitination de la protéine TFIIIA n'est pas connu (MAOR *et al.* 2007). Nous pouvons donc également supposer que l'ubiquitination de TFIIIA n'entraîne pas une reconnaissance par le protéasome 26S mais qu'elle pourrait, par exemple, participer à son activation transcriptionnelle.

II.3. De 2 à 10 jours post-germination

Notre choix s'est porté sur ces quelques jours du développement de la plante où notre équipe a démontré qu'il existe une forte réorganisation de la chromatine d'ADNr 5S (DOUET *et al.* 2008). En effet, la chromatine 5S passe par des stades de forte compaction puis

décompaction afin d'acquérir sa structure mature. Le comportement du facteur de transcription de ces gènes à un moment où ils subissent une importante réorganisation nous a donc paru intéressant.

A partir du 2ème jour, la période de post-germination peut être divisée en deux phases : avant et après le jour 4.

De 2 à 4 jours post-germination, la protéine TFIIIA pleine longueur, possédant l'activité transcriptionnelle, n'est pas détectée. La forme clivée de TFIIIA, TFIIIA-C, est, quant à elle, abondante. Bien qu'aucune protéine TFIIIA pleine longueur ne soit détectée à ces stades, les analyses RT-PCR ont montré que le transcrit ES était présent. Cela signifie que si les transcrits ES sont traduits à ces stades, les protéines TFIIIA sont clivées dans leur totalité, justifiant ainsi les forts taux de la forme clivée TFIIIA-C. Les ARNr 5S étant essentiels à la vie de la plante, la présence permanente de leur facteur de transcription était attendue. Mais la graine accumule des quantités importantes d'ARNr 5S et les cotylédons, déjà pré-formés dans la graine, ont sans doute des réserves d'ARNr 5S. Ces réserves pourraient donc être utilisées par la plante dans les premiers jours expliquant ainsi l'absence de TFIIIA. En effet, il a été montré par notre équipe que 20 % des ARNr 5S accumulés dans la graine proviennent de gènes d'ARNr 5S minoritaires (à 1 ou 2 mutations). A 2 jours post-germination, le même pourcentage d'ARNr 5S minoritaires est retrouvé alors qu'à partir de 4 jours, seuls des ARNr 5S majoritaires sont présents (MATHIEU *et al.* 2003a). De plus, nos résultats de northern blots montrent que les quantités d'ARNr 5S diminuent de 2 à 4 jours, appuyant ainsi l'hypothèse que, jusqu'au 4ème jour après la germination, la plante utilise les réserves d'ARNr 5S accumulées dans la graine. De la même manière, l'ovocyte de xénope accumule de grandes quantités d'ARNr 5S en prévision des nombreuses divisions cellulaires rapides qui auront lieu après la fécondation sans qu'il y ait transcription des gènes d'ARNr 5S, ni même des gènes d'ARNr 45S (WOLFFE and BROWN 1988). La transcription des gènes d'ARNr reprend lorsque leur chromatine est réorganisée (SRIVASTAVA and POLLARD 1999; YANG and HAYES 2003).

L'absence de TFIIIA dans les tous premiers jours du développement peut avoir plusieurs raisons. A ces stades, la « chromatine 5S » se réorganise en passant par une étape où l'ADNr 5S est fortement décompacté. Cette forte décompaction peut rendre accessibles les gènes d'ARNr 5S minoritaires les plus mutés qui ne sont jamais transcrits en contexte sauvage ou même dans des mutants de méthylation (MATHIEU *et al.* 2003a; VAILLANT *et al.*

2007). Or, il est fort probable que des ARNr 5S portant plus de multiples mutations ne permettent pas la formation de ribosomes viables contrairement aux ARNr 5S minoritaires à 1 ou 2 mutations retrouvées dans des polysomes (CLOIX *et al.* 2002). L'absence de TFIIIA pleine longueur empêcherait la synthèse d'ARNr 5S fortement mutés et donc la formation de ribosomes délétères pour la cellule. D'autre part, la fixation de TFIIIA et donc de l'ensemble du complexe de transcription au niveau des gènes d'ARNr 5S pourrait également perturber la réorganisation correcte de la chromatine 5S. De plus, les quantités importantes d'ARNr 5S accumulées dans la graine sont suffisantes pour que le développement de la plante ait lieu sans qu'il y ait besoin de transcrire des ARNr 5S et permettre ainsi la réorganisation de la chromatine d'ADNr 5S.

La protéine TFIIIA est détectée à partir du 4ème jour post-germination, lorsque la chromatine d'ADNr 5S acquiert sa structure mature et que les ARNr 5S s'accumulent de nouveau dans les cotylédons (DOUET *et al.* 2008). Il semble donc que lorsque la chromatine 5S est mature, c'est-à-dire qu'une partie des gènes d'ARNr 5S est organisée sous forme de boucles euchromatiques comme dans des cellules de feuilles d'une plante adulte, il y a reprise de l'accumulation de TFIIIA, entrainant une reprise de la transcription des gènes 5S, les quantités d'ARNr 5S s'accumulant de nouveau de 4 à 10 jours post-germination.

Chez Arabidopsis, les gènes d'ARNr 45S subissent, eux aussi, une réorganisation de leur chromatine dans les premiers jours du développement (PONTVIANNE *et al.* 2010) qui semble nécessaire à la reprise de leur expression. En effet, nos résultats préliminaires concernant l'ARNr 25S, résultant de la maturation du précurseur 45S, montrent un profil d'accumulation semblable à celui de l'ARNr 5S dans les premiers jours du développement (diminution jusqu'au 4ème jour puis nouvelle accumulation). Ce phénomène de réorganisation de la chromatine corrélé à la reprogrammation de la transcription de gènes, en réponse à des changements développementaux, a également été mis en évidence au moment de la transition florale ou de la maturation de la feuille (TESSADORI *et al.* 2007b; TESSADORI *et al.* 2004).

II.4. Dans la première paire de feuilles

Les résultats obtenus dans les cotylédons concernant le profil d'accumulation des protéines TFIIIA pleine longueur et clivée (TFIIIA-C) nous ont amenés à nous poser la question suivante : ce profil est-il une caractéristique des tissus jeunes en formation ?

Les résultats protéiques obtenus dans la première paire de feuilles ont montré que le profil d'accumulation des formes TFIIIA pleine longueur et TFIIIA-C, clivée, était semblable à celui observé dans les cotylédons. En effet, la protéine TFIIIA n'est pas présente dans les tous premiers jours de développement du tissu alors que la forme clivée est détectée. Il semble donc que la cinétique de clivage de la protéine TFIIIA soit représentative des tissus jeunes en formation. Cependant, un léger décalage de l'apparition de la protéine pleine longueur est observée dans la première paire de feuilles par rapport aux cotylédons. En effet, TFIIIA est détectée dès le 3ème jour dans les feuilles mais au 5ème jour après la germination dans les cotylédons. Ce décalage pourrait être justifié par les quantités de réserves d'ARNr 5S à partir desquelles se développe le nouveau tissu. En effet, dans les tous premiers jours de leur formation, les cotylédons, pré-formés dans la graine, se développent à partir des réserves de la graine, notamment en ARNr 5S (MATHIEU *et al.* 2003a). Au vu de nos résultats, les réserves de la graine semblent suffisantes pour que les cotylédons se développent jusqu'au 4ème jour sans qu'il y ait besoin d'une transcription d'ARNr 5S et donc accumulation de la protéine TFIIIA. Cependant, la première paire de feuilles provient d'une différentiation des cellules méristématiques où les réserves d'ARNr 5S sont certainement moindres que celles de la graine. Il est, toutefois, intéressant de noter, que dans les deux premiers jours qui suivent l'émergence des feuilles, il n'y a pas, pour la plante, nécessité d'accumuler de la protéine TFIIIA pleine longueur.

L'une des hypothèses expliquant l'importance du clivage protéolytique de TFIIIA dans les cotylédons est d'empêcher, à un moment où l'ensemble des unités 5S, même les plus mutées sont décompactées, la transcription des gènes d'ARNr 5S. Il serait donc judicieux de regarder le comportement de la chromatine d'ADNr 5S dans la première paire de feuilles de 2 à 5 jours après leur émergence. Les cellules de la première paire de feuilles proviennent de la spécialisation de cellules indifférenciées du méristème. La dédifférenciation de cellules est accompagnée d'une désorganisation des chromocentres, les régions répétées, telles que les

gènes d'ARNr 5S, sont fortement décompactées (TESSADORI *et al.* 2007a). Nous pouvons donc supposer que ces cellules méristématiques indifférenciées ne présentent pas la structure chromatinienne classique de noyaux de cellules de feuille. Il pourrait donc y avoir réorganisation de la chromatine et notamment de la chromatine d'ADNr 5S lors du développement de la feuille. Au moment de la différenciation de ces cellules, une activation de gènes d'identités des feuilles est accompagnée d'une inactivation de gènes « méristématiques » (ORI *et al.* 2000; SUN *et al.* 2002). Bien que la structure de la chromatine précise des cellules méristématiques n'ait jamais été déterminée, ce changement d'expression de gènes serait accompagné de modifications de la chromatine, notamment, au niveau des marques d'histones (CHUA *et al.* 2005).

III. Confirmation du clivage de la protéine TFIIIA

III.1. Mise en évidence de la partie N-terminale du clivage : TFIIIA-N

La détection de la forme clivée, TFIIIA-C, qui correspond à la partie C-terminale de TFIIIA et la stabilité de celle-ci, laisse supposer que la partie N-terminale de TFIIIA après le clivage peut également être détectée. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale en amont du premier doigt de zinc, l'anticorps Ac18, n'a, cependant, pas pu confirmer l'existence de cette protéine TFIIIA-N. En effet, bien qu'une protéine migrant aux alentours de 13 kDa ait été révélée par cet anticorps, et qu'elle présente un profil d'accumulation similaire à celle de TFIIIA-C, elle n'est pas détectée dans les siliques contrairement à la partie C-terminale, TFIIIA-C, qui est présente. De plus, cet anticorps est peu spécifique. Les deux lignées étiquetées en N-terminal pour TFIIIA ou en C-terminal (pHA-TFIIIA et pTFIIIA-Flag) permettront de confirmer les résultats obtenus avec des anticorps dirigés contre les étiquettes.

III.2. L'identification du site de clivage

Bien que deux anticorps différents (Ac16 et Ac17) révèlent la protéine TFIIIA-C, nous voulions confirmer son origine par séquençage. Nous avons donc décidé d'essayer de mettre

en évidence la protéine TFIIIA-C par LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) grâce à la plateforme « spectrométrie de masse et métabolisme » de l'INRA Clermont / Theix.

Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence des peptides correspondants à la protéine TFIIIA dans la zone de détection de TFIIIA-C. Des problèmes de quantités (TFIIIA-C provient du clivage d'un facteur de transcription peu exprimé) et la présence de nombreuses protéines de tailles voisines, ont manifestement empêché la réalisation de cette expérience. L'utilisation de la lignée pTFIIIA-Flag pourrait nous permettre, par immunoprécipitation grâce à l'étiquette de la forme clivée TFIIIA-C, d'obtenir la protéine TFIIIA-C en quantité plus importante et de l'isoler du reste de l'extrait protéique et ainsi améliorer les conditions de détection de peptides de TFIIIA-C par LC-MS/MS. Cette expérience pourrait également être réalisée avec la lignée pHA-TFIIIA si la protéine TFIIIA-N peut être détectée par la suite. A partir de ces mêmes lignées, un séquençage protéique de l'une des deux formes du clivage par la technique de dégradation d'Edman permettrait également de confirmer ce clivage. De plus, cette technique nous permettrait de mettre ainsi en évidence le site de clivage précis de la protéine TFIIIA.

IV. Facteurs de transcription et clivage protéolytique

Comme c'est le cas pour tous les autres organismes, la plante utilise le clivage protéolytique afin de réguler les taux de protéines fonctionnelles. La plupart du temps, ce clivage conduit à la dégradation de la protéine, c'est la protéolyse. Cependant, le clivage et les protéases responsables de ce dernier sont également des éléments clés de la régulation de différents processus en réponse au développement ou à l'environnement. Par exemple, le clivage protéolytique peut permettre l'activation de facteurs de transcription. C'est le cas, notamment, pour les facteurs de transcription membranaires qui sont l'exemple d'un contrôle et d'un ciblage précis du clivage protéolytique par la cellule. Ces facteurs de transcription sont insérés dans la membrane et par conséquent inactifs. Le clivage de ces facteurs de transcription membranaires va alors permettre leur libération et donc leur activation (CHEN *et al.* 2008).

Dans le cas de notre protéine d'intérêt, TFIIIA, le clivage protéolytique conduit à l'inactivation de ce facteur de transcription. La protéine TFIIIA pleine longueur de 44 kDa,

codée par le transcrit ES, correspond à la protéine fonctionnelle. Sa capacité à transcrire les gènes d'ARNr 5S *in vitro* a été démontrée (MATHIEU *et al.* 2003b). Le clivage protéolytique de TFIIIA génère une forme plus courte de 34 kDa, TFIIIA-C. La position de l'anticorps Ac16 et le poids moléculaire de TFIIIA-C laissent supposer que le clivage aurait lieu au niveau du doigt de zinc 3. Nous avons montré qu'une protéine TFIIIA délétée de ses deux premiers doigts de zinc (Trunc-TFIIIA) n'est pas capable d'induire l'expression des gènes d'ARNr 5S dans un système de transcription *in vitro*. Chez la levure, le doigt de zinc 1 est responsable du recrutement de TFIIIC et donc de l'ensemble du complexe de transcription pol III (ROTHFELS *et al.* 2007). La protéine TFIIIA-C, ne possédant pas les doigts de zinc 1 et 2 indispensables à la transcription, ne peut donc pas posséder l'activité transcriptionnelle de TFIIIA. Chez Arabidopsis, le clivage protéolytique de TFIIIA permet donc à la cellule de réguler le taux de protéine TFIIIA fonctionnelle en fonction des stades de développement et de ses besoins en ARNr 5S. Ce clivage est donc un niveau supplémentaire de la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S.

Le facteur de transcription des gènes d'ARNr 45S est lui aussi clivé chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, trois isoformes de la nucléoline, *At*NUC-L1, (82, 67, 46 kDa) sont détectées avec un anticorps anti-nucléoline (PONTVIANNE *et al.* 2007). Contrairement à TFIIIA dont on sait que la forme de 44 kDa est la forme fonctionnelle, l'isoforme fonctionnelle de la nucléoline est inconnue. Il serait intéressant d'étudier la cinétique d'accumulation des trois isoformes de la nucléoline dans les mêmes fenêtres de temps étudiées pour TFIIIA, chez Arabidopsis. Associée aux profils d'accumulation des ARNr 45S, cette étude pourrait nous éclairer sur les rôles de ces différentes isoformes. Chez le xénope, le clivage de la nucléoline a également été mis en évidence. Il semble d'ailleurs que ce clivage protéolytique soit nécessaire à la transcription des gènes d'ARNr 45S (CAIZERGUES-FERRER *et al.* 1987; CAIZERGUES-FERRER *et al.* 1989; WARRENER and PETRYSHYN 1991). Le clivage de la protéine TFIIIA de xénope, *in vitro*, avait déjà été suggéré en 1986 par Kmiec *et al.* (KMIEC and WORCEL 1986). Ces observations montrent donc l'importance de la régulation précise des gènes d'ARNr en contrôlant notamment les taux de leurs facteurs de transcription fonctionnels, que ce soit chez les plantes ou les animaux.

IV.1. Les acteurs responsables du clivage de TFIIIA

Bien que la position approximative du clivage ait pu être déterminée à partir de la position des anticorps et du poids moléculaire de la protéine TFIIIA-C, la protéase responsable de ce clivage ne peut être clairement identifiée. En effet, le nombre de gènes codant pour des protéases chez *Arabidopsis thaliana* dépasse les 800 ; elles sont réparties en 60 familles (VAN DER HOORN 2008). Bien que l'impact de la mutation de certaines d'entre elles donne un phénotype marqué, la majorité des protéases n'a pas été caractérisée et l'étude de leur mécanisme d'action a juste commencé. De plus, malgré l'abondance et l'implication biologique importante des protéases dans la vie de la plante, peu de substrats naturels de ces protéases sont aujourd'hui connus (TSIATSIANI *et al.* 2011).

Le clivage protéolytique aurait lieu au niveau du doigt de zinc 3, au vu de la position des anticorps et du poids moléculaire de TFIIIA-C, il doit certainement résulter de l'action d'une endopeptidase. TFIIIA possède des doigts de zinc de type Cys_2His_2. Les cystéine-protéases utilisant une cystéine comme cible de la protéolyse, la protéine TFIIIA pourrait être une cible potentielle de ces protéases. Cependant, environ 140 protéases ont été identifiées comme appartenant à cette classe (VAN DER HOORN 2008). Ce nombre reste donc trop important pour tester ces protéases comme des candidats potentiels.

IV.2. Rôles potentiels des formes clivées

Il est évident que la fonction principale du clivage protéolytique de TFIIIA, chez Arabidopsis, est de réguler le taux de protéine fonctionnelle. Cependant, TFIIIA-C est retrouvée de façon stable dans les tissus. Cette protéine contient certainement les six derniers doigts de zinc de TFIIIA. Ces doigts de zinc, chez le xénope et la levure, permettent la fixation de l'ADNr et de l'ARNr 5S. Or, nous avons montré qu'une protéine contenant les sept derniers doigts de zinc est capable de lier à la fois l'ARNr 5S et l'ADNr 5S, toutefois, avec une affinité moindre que TFIIIA et sans pour autant activer la transcription des gènes 5S, chez Arabidopsis (VAILLANT 2006).

Nous pourrions imaginer que, du clivage de TFIIIA, résulte un répresseur de l'expression des gènes d'ARNr 5S. TFIIIA-C pourrait en effet se fixer au niveau des gènes 5S notamment pendant la phase de réorganisation de la chromatine d'ADNr 5S, empêchant

ainsi leur transcription, ou bien entrer en compétition avec la protéine active TFIIIA tout au long du développement. Il serait intéressant de tester l'effet d'une compétition entre TFIIIA et TFIIIA-C, sur l'expression des gènes d'ARNr 5S, dans un système de transcription *in vitro*.

Perspectives

La chromatine d'ADNr 5S a la particularité d'être répartie en trois domaines relativement distincts dont on suppose qu'ils sont en relation avec l'expression des gènes d'ARNr 5S:

- l'euchromatine, où, en contexte sauvage, seuls les gènes d'ARNr 5S majoritaires exprimés sont localisés,
- l'hétérochromatine dite facultative, où les gènes 5S minoritaires à 1 ou 2 mutations sont exprimés dans des mutants de méthylation ou dans des tissus accumulant de grandes réserves d'ARNr 5S ; ces unités ont donc un rôle de réserves,
- l'hétérochromatine constitutive, où sont localisées les unités 5S les plus mutées, qui ne sont jamais exprimées, qui pourraient intervenir dans le maintien de la stabilité du génome.

Par des expériences de ChIP réalisées avec un anticorps anti-TFIIIA, en contexte sauvage ou mutant pour la structure de la chromatine, l'état transcriptionnel des gènes d'ARNr 5S pourra ainsi être déterminé et associé au statut de la chromatine d'ADNr 5S. Ceci sera particulièrement intéressant pour la région hétérochromatique facultative de ces gènes pour laquelle il serait intéressant de savoir si TFIIIA est toujours présent sur ces gènes ou seulement lorsqu'ils sont transcrits ?

D'une façon plus générale, au delà de l'analyse de l'expression de la protéine TFIIIA et des gènes d'ARNr 5S à différentes étapes du développement, cette thèse a permis de mettre au point plusieurs outils (différentes lignées étiquetées, anticorps…) qui pourront, à terme, être utilisés dans les nouvelles thématiques de l'équipe. En effet, actuellement deux nouvelles thématiques, utilisant les connaissances que nous avons accumulées sur l'ADNr 5S, sont en train de se développer.

La première concerne l'étude des variants d'histone H3 ainsi que de leurs chaperonnes, et leur implication dans les premiers jours du développement de la plante. L'un des objectifs de cet ces travaux de recherche est de déterminer quels variants d'histone H3 sont incorporés dans les nucléosomes au cours des différentes étapes de la réorganisation de la chromatine et de déterminer si certains variants sont associés à la reprise de la transcription des gènes d'ARNr 5S à partir du 4ème jour post-germination.

La deuxième thématique est l'étude des composants impliqués dans l'architecture nucléaire et l'étude du positionnement de l'hétérochromatine à l'intérieur du noyau. La protéine TFIIIA et les gènes d'ARNr 5S pourraient répondre à certaines des questions de cette thématique. En effet, il semblerait que les gènes d'ARNr 5S transcrits soient localisés aux alentours du nucléole, lieu d'assemblage des ribosomes et de la transcription des gènes d'ARNr 45S (FRANSZ *et al.* 2002; MONTIJN *et al.* 1999). Des expériences d'immunocytologie sur des noyaux de cellules d'Arabidopsis avec les anticorps anti-TFIIIA mis au point au cours de cette thèse mais aussi l'utilisation des différentes lignées étiquetées pourraient permettre de localiser précisément les gènes d'ARNr 5S exprimés à l'intérieur du noyau.

Matériel et Méthodes

I. Plantes et conditions de cultures

I.1. Conditions de culture classique

Des graines d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia, sont semées soit sur terreau puis cultivées en serre avec une photopériode de 18h à 22°C, soit sur milieu de germination MS (MS salt, Duchefa biochimie) supplémenté avec 1% de saccharose et 8% de BactoAgar, ajusté à pH 5,7, puis cultivées en chambre de culture à 23°C avec une photopériode de 16h, après synchronisation des graines 2 jours à 4°C. Les cotylédons sont collectés à 2, 3, 4, 5 et 10 jours après la germination. Pour l'étude de plantule entière de 10 jours, seule la partie aérienne est conservée, les racines sont supprimées. La première paire de feuilles à se former après les cotylédons est récoltée de 2 à 5 jours après son émergence. Les fleurs, les siliques et les graines sont récoltées sur des plantes cultivées en serre, sur terreau.

I.2. Conditions de stress

Des graines de plantes sauvages d'écotype Columbia, de plantes de la lignée complémentée par le transcrit ES seul, ES-plantes, et de la lignée complémentée par le gène TFIIIA, geno-plants, sont semées sur le milieu MS classique, ou sur milieu MS supplémenté par 50 mM ou 100 mM de NaCl ou 200 mM de mannitol. Les parties aériennes de ces plantules, stressées ou non, sont récoltées 10 jours après la germination.

I.3. Etablissement de lignées transgéniques

I.3.1. Construction des vecteurs d'intérêt

Pour l'ensemble des constructions, la même stratégie est utilisée. Les séquences d'intérêt sont amplifiées à partir d'ADN extrait de plante d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia dans le cadre d'une construction de type génomique ou à partir d'ARNm dans le cadre d'une construction utilisant l'ADNc. Une fois le fragment ADN amplifié, il est dans un premier temps cloné dans un vecteur pGEM®-T Easy (Promega) ou dans un vecteur pCR®-

Blunt II-TOPO® (Invitrogen). Après vérification de sa séquence (GATC Biotech, Zurich, Germany) le fragment est transféré dans le vecteur d'intérêt.

Dans le cas des clonages pour les lignées : pORF1-Flag, pORF2-StrepII, pTFIIIA-Flag et les lignées de complémentation par ES, EI ou le gène TFIIIA entier, le clonage est réalisé après amplification des fragments d'intérêts à l'aide d'oligonucléotides contenant des sites de restrictions judicieusement choisi.

Dans le cas des lignées : RNAi-EI et pHis-TFIIIA, le clonage est réalisé selon la stratégie de LR recombinaison. Pour cela, le fragment d'intérêt (l'exon alternatif ou l'ADNc complet de ES) est cloné dans un plasmide de type pDONR entre les sites de recombinaisons AttL1 et AttL2, nécessaires à la réaction de LR recombinaison avant d'être transféré dans le vecteur d'expression choisi, portant des sites AttR1 et AttR1. La réaction de LR recombinaison est réalisée avec le kit Gateway® LR ClonaseTM Plus Enzyme Mix (Invitrogen) suivant les instructions du fournisseur.

Dans tous les cas, une fois l'insert inséré dans le vecteur final d'expression, des bactéries *E.coli* de type DH5α ou One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen) sont transformées par choc thermique avec ce vecteur final puis mises à pousser sur milieu sélectif (milieu contenant l'antibiotique de sélection du vecteur). Des minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées sur les colonies ayant poussé sur milieu sélectif et la présence de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique.

I.3.2. Transformation de plantes

Le vecteur portant la construction d'intérêt est introduit par électroporation dans la souche d'*Agrabocterium tumefaciens* C58C1. Les agrobactéries transformées ont été cultivées dans 5 ml de milieu 2YT (pré-culture) supplémenté en antibiotiques (Rifampicine 50 mg/ml, Gentamycine 100 mg/ml, antibiotique de sélection du vecteur 100 mg/ml). Après 24 heures de pré-culture, 2 ml de la préculture sont incubés dans 200 ml de milieu 2YT avec 2 ml de $MgSO_4$ 1M et supplémenté en antibiotiques (Gentamycine 100 mg/ml, antibiotique de sélection du plasmide 100 mg/ml). La culture est mise sous agitation à 200 rpm et 28°C jusqu'à obtention d'une DO, à 600 nm, comprise entre 0.6 et 0.8. La culture d'agrobactéries est alors centrifugée à 4000 g pendant 10 minutes et le culot est repris dans 100 ml de milieu d'infiltration (Cf. Annexe). Les transformations de plantes d'*A. thaliana* d'écotype

Columbia sont faites sur des plantes adultes d'environ 4 semaines après que la première hampe floral ait été coupée afin d'induire la pousse d'hampes secondaires et donc d'obtenir plus de bourgeons. La méthode utilisée pour la transformation est dite du « floral dip » (BECHTOLD and PELLETIER 1998). Les inflorescences des plantes sont alors trempées pendant 5 à 10 secondes dans le milieu d'infiltration qui contient les agrobactéries porteuses du vecteur (Cf Annexe). Les plantes sont laissées dans la serre jusqu'à obtention de graines.

I.4. La lignée mutante TFIIIA

La lignée mutante TFIIIA utilisée au cours de ma thèse est une lignée d'insertion T-DNA. Cette lignée SALK_008626 est issue de la collection de mutants SALK. Le T-DNA est inséré au niveau de l'exon 5 du gène TFIIIA.

II. Etude de l'expression des transcrits ES et EI et de l'accumulation des ARNr 5S

II.1. Extraction d'ARN totaux

Pour les extractions de cotylédons, de plantules entière et de fleurs, 50 à 100 mg de tissus sont homogénéisés dans un tube eppendorf avec du sable et 500 µl de tampon guanidine (Cf. Annexe). L'ARN est purifié par deux étapes d'extraction phénol/CIA, puis précipité au moins 20 minutes à -20°C en présence de 0,2 volume d'acide acétique 1M et 0,7 volume d'éthanol 100%. Après 30 minutes de centrifugation à 4°C et 10000 rpm, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, puis repris dans 30 µl d'eau traitée au DEPC.

Les siliques et les graines sont des tissus riches en lipides et protéines de stockages qui nécessitent un autre protocole d'extraction au LiCl. Les ARN sont extraits selon le protocole décrit par Vicient *et al.* (VICIENT and DELSENY 1999). Environ 100 mg de tissus sont broyés dans de l'azote liquide. Le broyat est incubé dans du tampon d'extraction préalablement refroidi à -20°C, toute une nuit sous agitation à 4°C (Cf. Annexe). Après une rapide centrifugation, le surnageant est centrifugé 30 minutes à 4°C et 13000 rpm. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, et repris dans tampon de solubilisation (Cf. Annexe). L'ARN

A.

B.

RT-PCR TFIIIA17/TFIIIA18

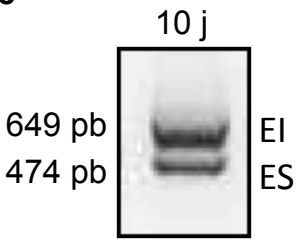


Figure 30 : Le couple d'amorces TFIIIA17/TFIIIA18 permet d'amplifier les deux transcrits du gène TFIIIA, ES et EI.

A. Les amorces TFIIIA17 et TFIIIA18 sont situées de part et d'autre de l'exon alternatif « 5S-like » représenté, ici, par le rectangle bleu foncé. L'amorce TFIIIA17 est située dans l'exon 2 et l'amorce TFIIIA18, dans l'exon 3. Les exons sont représentés par les rectangles bleus et les introns par les traits noirs.

B. Lors d'une même réaction de RT-PCR, les deux transcrits, ES et EI, vont être amplifiés par le couple d'amorces TFIIIA17/TFIIIA18, et sont distincts en taille.

est alors purifié par deux étapes d'extraction phénol, une étape d'extraction phénol/CIA et deux extractions CIA. La dernière phase aqueuse est précipitée avec 0,1 volume de NaAc 3M et 1,5 volume d'éthanol 100%. Après 30 minutes de centrifugation à 4°C et 13000 rpm, le culot est repris dans 0,5 ml de NaAc 3M. Une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 4°C et 13000 rpm permet d'obtenir un culot qui sera lavé avec 1 ml d'éthanol 70% et resuspendu dans environ 50 µl d'eau traitée DEPC.

Les ARN obtenus sont dosés à l'aide d'un nanodrop (Thermo Scientific).

II.2. Analyse de l'expression des transcrits ES et EI par RT-PCR semi-quantitative

Des aliquots de 2 µg d'ARN totaux sont traités avec le kit DNase RQ1 (Promega), dans le but d'éliminer les traces d'ADN contaminant. 100 ng des ces ARN traités à la DNase servent de matrice à une RT-PCR semi-quantitative via le kit OneStep RT-PCR (Qiagen). Dans le but détecter une contamination résiduelle en ADN, une PCR contrôle est réalisée sans la première étape de transcription inverse. Afin de conserver le ratio ES/EI observé dans un stade ou tissus donné tels qui sont dans ce stade ou tissus, un seul couple d'amorces a été choisi pour amplifier les deux cDNA en une même réaction de RT-PCR. En effet, l'utilisation de deux couples d'amorces différents aurait entrainé le risque d'une efficacité d'amplification différente selon les couples d'amorces et donc créé un biais dans l'analyse des expressions des deux transcrits. Les amorces choisies sont situées de part et d'autre de l'exon alternatif, ce qui permet d'amplifier les deux transcrits ES et EI en une seule réaction et de les distinguer par leur taille (Figure 30). L'actine a été utilisée comme contrôle interne à ces expériences de RT-PCR. Les conditions d'amplifications sont décrites dans le tableau 3 et les amorces utilisées sont données dans le tableau 4.

Après migration sur gel d'agarose coloré au BET (Bromure d'éthidium), les gels sont photographiés grâce à un imager Versadoc (Bio-Rad Laboratories) puis quantifiés avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

II.3. Etude de l'accumulation des ARNr 5S par Northern Blot

L'analyse de l'accumulation des ARNr 5S est réalisée par Northern Blot suivant les procédures standard. 5 µg d'ARN totaux sont fractionnés sur un gel d'agarose 1% contenant

Tableau 3 : Conditions de RT-PCR selon le kit OneStep RT-PCR (Qiagen)

RT	50°C	30 min	1 cycle	
Activation PCR	95°C	15 min	1 cycle	
PCR	95°C	30 s	TFIIIA17/18 29 cycles	ACT2F/2R 26 cycles
	Tm amorce	30 s		
	72°C	30 s		
	72°C	10 min	1 cycle	

Tableau 4 : Amorces utilisées

Nom de l'amorce	**Sequence**	**Tm utilisé**	**Gène cible**	**Taille de l'amplification**
TFIIIA 17	CTCACTTGAAGCAGCATATGC	58°C	TFIIIA	ES= 474 pb EI=629 pb
TFIIIA 18	TCCTGATGCTTTTGAAGCTGTG			
ACT2F	CCTTGTACGCCAGTGGTCG	52 °C	Actine 2	666 pb
ACT2R	CTCGGCCTTGGAGATCCAC			

1,9% formaldéhyde (Cf. Annexe). Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane Hybond- N (Ge Healthcare Biosciences) par capillarité toute une nuit dans du tampon SSC 10X. Les membranes sont hybridées avec une sonde ARNr 5S ainsi qu'avec une sonde unique RAN, en guise de contrôle interne. Les ARNr 5S étant plus abondants que les ARN RAN, la sonde RAN est hybridée en premier. Les sondes sont marquées avec du [α-^{32}P] dCTP radioactif avec le kit Megaprime DNA labelling system (Amersham) suivant les instructions du fournisseur. Pour la quantification, un phosphoimager Molecular Imager FX (Bio-Rad) et le logiciel Quantity One (Bio-Rad) sont utilisés.

III. Etude de la protéine TFIIIA

III.1. Extraction protéique

Les tissus récoltés, environ 500 mg, sont broyés à 4°C dans du tampon d'extraction froid (Cf. Annexe). Les échantillons sont ensuite centrifugés 30min à 14 000 rpm, à 4°C. Les protéines solubles contenues dans le surnageant sont dosées selon la méthode Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

III.2. Western blot

Le Western blot est réalisé selon les procédures standard. 40 μg d'extrait total de protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 10% (Tris-glycine-SDS) dans du tampon de migration (Cf. Annexe), à 200 V constant pendant environ 1h30 puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, GE Healthcare) par un transfert semi-sec (Trans-Blot Semi-Sec Bio-Rad) dans du tampon de transfert (Cf. Annexe), 45 min à 15 V constant. La qualité des dépôts et du transfert est vérifiée par une coloration de la membrane au Rouge Ponceau 0,1%. Une fois rincée dans du PBS-T, la membrane est saturée pendant une heure à température ambiante avec du PBS-T/Régilait 5% puis incubée toute une nuit à 4°C avec les anticorps polyclonaux de lapins Ac16 (dilution au 1/2000) ou Ac17 (dilution au 1/1000). Après 3 rinçages de 5 min dans du PSB-T, la membrane est incubée une heure à température ambiante avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la HRP (GE

Healthcare) (dilution au 1/10000) dans du PBS-T/régilait 5%. La révélation de la membrane se fait avec le kit ECL+ Western Blotting Detection Reagents (Ge Heathcare) selon les instructions du fournisseur. La membrane est ensuite exposée avec un film autoradiographique (Hyperfilm MR Amersham) pour une durée variable selon les anticorps. Afin de pouvoir normaliser les résultats, la membrane est ensuite hybridée avec un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma) (dilution au 1/2000) dans du PBS-T/Régilait 5% et incubée une nuit à 4°C. Elle est ensuite révélée avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la HRP (Ge Heathcare) (dilution au 1/10000). La membrane est révélée avec le kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Ge Heathcare) selon les instructions du fournisseur, et exposée avec un film autoradiographique. Les films obtenus pour les différents anticorps sont scannés et analysés avec le logiciel Quantity One.

Une analyse a également été réalisée avec un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de *At*TFIIIA, l'anticorps Ac18, suivant le même protocole décrit précédemment. Cependant, les extraits sont séparés sur gel de polyacrylamide à 15%. Pour cela, l'anticorps Ac18 est utilisé à la dilution suivante : 1/2000 et révélé avec le kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Ge Heathcare).

III.3. Les anticorps anti-TFIIIA

Trois anticorps dirigés contre trois peptides différents de TFIIIA sont disponibles au laboratoire (Figure 20 partie Résultats). Ces anticorps ont été fabriqués par Eurogentec (Angers, France).

L'anticorps polyclonal de lapin Ac16 est dirigé contre la séquence peptidique (CKGDDDKEKSGSGG) située entre les positions 169 et 182 de la région centrale de *At*TFIIIA, entre les doigts de zinc 4 et 5.

L'anticorps polyclonal de lapin Ac17 est dirigé contre la séquence peptidique (CGDFVETDEDFTSRPR) située entre les positions 278 et 293 de la partie C-terminale de *At*TFIIIA, après le doigt de zinc 9.

L'anticorps polyclonal de lapin Ac18 est dirigé contre la séquence peptidique (AEEAKVDVKTSAKKD) située dans la partie N-terminale de *At*TFIIIA entre les positions 2 et 16, en amont du doigt de zinc 1.

III.4. Séquençage par LC-MS/MS

Les protéines de la partie aérienne d'une plantule de 10 jours ont été extraites comme mentionné en III.1. . Deux migrations sur gel en parallèle, de ce même extrait total ont été réalisées. L'un des gels a été coloré au bleu de Coomassie et l'autre gel a servi à réaliser un western blot avec l'Ac17 pour détecter TFIIIA et TFIIIA-C, selon le protocole présenté en III.2. Une fois la révélation du western blot réalisée, la bande de gel de polyacrylamide correspondant à la zone de détection de TFIIIA-C sur le western blot, a été prélevée sur le gel coloré au bleu de Coomassie et utilisée comme source pour la LC-MS/MS. L'ensemble de l'expérience a été réalisé en conditions « keratin-free » afin de limiter les contaminations en kératine qui auraient pu empêcher par la suite l'analyse des résultats. La LC-MS/MS a ensuite été réalisée par la plateforme « spectrométrie de masse et métabolisme » de l'INRA Clermont / Theix.

III.5. Traitement de plantules au MG132

Le MG132 est un inhibiteur de la voie ubiquitine-protéasome 26S. Des plantules entières de 10 jours ont été transférées en milieu liquide MS à 1% saccharose, contenant des concentrations finales de MG132, de 10 μM ou de 50 μM. Le MG132 étant un composé qui se dissout dans du DMSO, des plantules témoins ont donc également été transférées dans un milieu supplémenté avec des quantités équivalentes en DMSO seul. Les plantules ont été incubées à température ambiante sous agitation. Elles ont ensuite été récoltées 4 heures ou 8 heures après le transfert. L'extraction protéique ainsi que l'analyse par western blots ont été réalisées comme indiqué en II.1 et II.2, respectivement.

Références

ACKER, J., C. OZANNE, R. KACHOURI-LAFOND, C. GAILLARDIN, C. NEUVEGLISE *et al.*, 2008 Dicistronic tRNA-5S rRNA genes in Yarrowia lipolytica: an alternative TFIIIA-independent way for expression of 5S rRNA genes. Nucleic Acids Res **36:** 5832-5844.

ADAMS, C. C., and J. L. WORKMAN, 1993 Nucleosome displacement in transcription. Cell **72:** 305-308.

AGI, 2000 Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. . Nature**:** 796-815.

ALLISON, L. A., P. J. ROMANIUK and A. H. BAKKEN, 1991 RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during Xenopus oogenesis. Dev Biol **144:** 129-144.

AMMONS, D., J. RAMPERSAD and G. E. FOX, 1999 5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in Escherichia coli. Nucleic Acids Res **27:** 637-642.

ARCHAMBAULT, J., C. A. MILNE, K. T. SCHAPPERT, B. BAUM, J. D. FRIESEN *et al.*, 1992 The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from Saccharomyces cerevisiae reveals extensive divergence from Xenopus TFIIIA. J Biol Chem **267:** 3282-3288.

AUFSATZ, W., M. F. METTE, J. VAN DER WINDEN, A. J. MATZKE and M. MATZKE, 2002 RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **99 Suppl 4:** 16499-16506.

BAKER, K. E., and R. PARKER, 2004 Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. Curr Opin Cell Biol **16:** 293-299.

BARTHOLOMEW, B., G. A. KASSAVETIS, B. R. BRAUN and E. P. GEIDUSCHEK, 1990 The subunit structure of Saccharomyces cerevisiae transcription factor IIIC probed with a novel photocrosslinking reagent. EMBO J **9:** 2197-2205.

BECHTOLD, N., and G. PELLETIER, 1998 In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. Methods Mol Biol **82:** 259-266.

BEELMAN, C. A., and R. PARKER, 1994 Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. J Biol Chem **269:** 9687-9692.

BESSER, D., F. GOTZ, K. SCHULZE-FORSTER, H. WAGNER, H. KROGER *et al.*, 1990 DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. FEBS Lett **269:** 358-362.

BHAT, K. P., and S. F. GREER, 2011 Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. Biochim Biophys Acta **1809:** 150-155.

BIEKER, J. J., P. L. MARTIN and R. G. ROEDER, 1985 Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. Cell **40:** 119-127.

BLEVINS, T., O. PONTES, C. S. PIKAARD and F. MEINS, JR., 2009 Heterochromatic siRNAs and DDM1 independently silence aberrant 5S rDNA transcripts in Arabidopsis. PLoS One **4:** e5932.

BOGENHAGEN, D. F., and D. D. BROWN, 1981 Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. Cell **24:** 261-270.

BOGENHAGEN, D. F., S. SAKONJU and D. D. BROWN, 1980 A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. Cell **19:** 27-35.

BOUVET, P., S. DIMITROV and A. P. WOLFFE, 1994 Specific regulation of Xenopus chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1. Genes Dev **8:** 1147-1159.

BRAUN, B. R., D. L. RIGGS, G. A. KASSAVETIS and E. P. GEIDUSCHEK, 1989 Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on Saccharomyces cerevisiae 5S ribosomal RNA genes. Proc Natl Acad Sci U S A **86:** 2530-2534.

CAIZERGUES-FERRER, M., P. BELENGUER, B. LAPEYRE, F. AMALRIC, M. O. WALLACE *et al.*, 1987 Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. Biochemistry **26:** 7876-7883.

CAIZERGUES-FERRER, M., P. MARIOTTINI, C. CURIE, B. LAPEYRE, N. GAS *et al.*, 1989 Nucleolin from Xenopus laevis: cDNA cloning and expression during development. Genes Dev **3:** 324-333.

CAMMAS, F., M. OULAD-ABDELGHANI, J. L. VONESCH, Y. HUSS-GARCIA, P. CHAMBON *et al.*, 2002 Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. J Cell Sci **115:** 3439-3448.

CAMPELL, B. R., Y. SONG, T. E. POSCH, C. A. CULLIS and C. D. TOWN, 1992 Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of Arabidopsis thaliana. Gene **112:** 225-228.

CAO, X., and S. E. JACOBSEN, 2002 Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. Curr Biol **12:** 1138-1144.

CHALLICE, J. M., and J. SEGALL, 1989 Transcription of the 5 S rRNA gene of Saccharomyces cerevisiae requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. J Biol Chem **264:** 20060-20067.

CHEN, Y. N., E. SLABAUGH and F. BRANDIZZI, 2008 Membrane-tethered transcription factors in Arabidopsis thaliana: novel regulators in stress response and development. Curr Opin Plant Biol **11:** 695-701.

CHEN-SCHMEISSER, U., and R. A. GARRETT, 1977 A new method for the isolation of a 5 S RNA complex with proteins L5, L18 and L25 from Escherichia coli ribosomes. FEBS Lett **74:** 287-291.

CHIPEV, C. C., and A. P. WOLFFE, 1992 Chromosomal organization of Xenopus laevis oocyte and somatic 5S rRNA genes in vivo. Mol Cell Biol **12:** 45-55.

CHUA, Y. L., S. CHANNELIERE, E. MOTT and J. C. GRAY, 2005 The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in Arabidopsis by histone acetylation at ASYMMETRIC LEAVES1. Genes Dev **19:** 2245-2254.

CIHLAR, R. L., and P. S. SYPHERD, 1980 The organization of the ribosomal RNA genes in the fungus Mucor racemosus. Nucleic Acids Res **8:** 793-804.

CLEMENS, K. R., X. LIAO, V. WOLF, P. E. WRIGHT and J. M. GOTTESFELD, 1992 Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. Proc Natl Acad Sci U S A **89:** 10822-10826.

CLEMENS, K. R., V. WOLF, S. J. MCBRYANT, P. ZHANG, X. LIAO *et al.*, 1993 Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. Science **260:** 530-533.

CLOIX, C., S. TUTOIS, O. MATHIEU, C. CUVILLIER, M. C. ESPAGNOL *et al.*, 2000 Analysis of 5S rDNA arrays in Arabidopsis thaliana: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. Genome Res **10:** 679-690.

CLOIX, C., S. TUTOIS, Y. YUKAWA, O. MATHIEU, C. CUVILLIER *et al.*, 2002 Analysis of the 5S RNA pool in Arabidopsis thaliana: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. Genome Res **12:** 132-144.

CLOIX, C., Y. YUKAWA, S. TUTOIS, M. SUGIURA and S. TOURMENTE, 2003 In vitro analysis of the sequences required for transcription of the Arabidopsis thaliana 5S rRNA genes. Plant J **35:** 251-261.

CONDON, C., D. LIVERIS, C. SQUIRES, I. SCHWARTZ and C. L. SQUIRES, 1995 rRNA operon multiplicity in Escherichia coli and the physiological implications of rrn inactivation. J Bacteriol **177:** 4152-4156.

CUCCURESE, M., G. RUSSO, A. RUSSO and C. PIETROPAOLO, 2005 Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. Nucleic Acids Res **33:** 5965-5977.

DARBY, M. K., and K. E. JOHO, 1992 Differential binding of zinc fingers from Xenopus TFIIIA and p43 to 5S RNA and the 5S RNA gene. Mol Cell Biol **12:** 3155-3164.

DENIS, H., and M. LE MAIRE, 1983 Thesaurisomes, a novel kind of nucleoprotein particle. Subcell Biochem **9:** 263-297.

DEPROST, D., L. YAO, R. SORMANI, M. MOREAU, G. LETERREUX *et al.*, 2007 The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. EMBO Rep **8:** 864-870.

DESHMUKH, M., Y. F. TSAY, A. G. PAULOVICH and J. L. WOOLFORD, JR., 1993 Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. Mol Cell Biol **13:** 2835-2845.

DIMITROV, S., G. ALMOUZNI, M. DASSO and A. P. WOLFFE, 1993 Chromatin transitions during early Xenopus embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. Dev Biol **160:** 214-227.

DOKUDOVSKAYA, S., O. DONTSOVA, O. SHPANCHENKO, A. BOGDANOV and R. BRIMACOMBE, 1996 Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. RNA **2:** 146-152.

DOUET, J., 2008 ADN ribosomique 5S chez Arabidopsis thaliana:Dynamique chromatinienne et ARN polymérase IV, pp. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

DOUET, J., B. BLANCHARD, C. CUVILLIER and S. TOURMENTE, 2008 Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. Plant Cell Physiol **49:** 1783-1791.

DOUET, J., S. TUTOIS and S. TOURMENTE, 2009 A Pol V-mediated silencing, independent of RNA-directed DNA methylation, applies to 5S rDNA. PLoS Genet **5:** e1000690.

DREW, P. D., J. W. NAGLE, R. D. CANNING, K. OZATO, W. E. BIDDISON *et al.*, 1995 Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA. Gene **159:** 215-218.

DUMAY-ODELOT, H., C. MARCK, S. DURRIEU-GAILLARD, O. LEFEBVRE, S. JOURDAIN *et al.*, 2007 Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIIC. J Biol Chem **282:** 17179-17189.

ENGELKE, D. R., S. Y. NG, B. S. SHASTRY and R. G. ROEDER, 1980 Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. Cell **19:** 717-728.

FILICHKIN, S. A., H. D. PRIEST, S. A. GIVAN, R. SHEN, D. W. BRYANT *et al.*, 2010 Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. Genome Res **20:** 45-58.

FINNEGAN, E. J., W. J. PEACOCK and E. S. DENNIS, 1996 Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. Proc Natl Acad Sci U S A **93:** 8449-8454.

FRANSZ, P., S. ARMSTRONG, C. ALONSO-BLANCO, T. C. FISCHER, R. A. TORRES-RUIZ *et al.*, 1998 Cytogenetics for the model system Arabidopsis thaliana. Plant J **13:** 867-876.

FRANSZ, P., J. H. DE JONG, M. LYSAK, M. R. CASTIGLIONE and I. SCHUBERT, 2002 Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. Proc Natl Acad Sci U S A **99:** 14584-14589.

FRIDELL, R. A., U. FISCHER, R. LUHRMANN, B. E. MEYER, J. L. MEINKOTH *et al.*, 1996 Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. Proc Natl Acad Sci U S A **93:** 2936-2940.

FU, Y., O. BANNACH, H. CHEN, J. H. TEUNE, A. SCHMITZ *et al.*, 2009 Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA. Genome Res **19:** 913-921.

FULNECEK, J., R. MATYASEK, A. KOVARIK and M. BEZDEK, 1998 Mapping of 5-methylcytosine residues in Nicotiana tabacum 5S rRNA genes by genomic sequencing. Mol Gen Genet **259:** 133-141.

GABRIELSEN, O. S., N. MARZOUKI, A. RUET, A. SENTENAC and P. FROMAGEOT, 1989 Two polypeptide chains in yeast transcription factor tau interact with DNA. J Biol Chem **264:** 7505-7511.

GHOSE, R., M. MALIK and P. W. HUBER, 2004 Restricted specificity of Xenopus TFIIIA for transcription of somatic 5S rRNA genes. Mol Cell Biol **24:** 2467-2477.

GINSBERG, A. M., B. O. KING and R. G. ROEDER, 1984 Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. Cell **39:** 479-489.

GOLDSBROUGH, P. B., T. H. ELLIS and G. P. LOMONOSSOFF, 1982 Sequence variation and methylation of the flax 5S RNA genes. Nucleic Acids Res **10:** 4501-4514.

GOTTLIEB, E., and J. A. STEITZ, 1989 Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. EMBO J **8:** 851-861.

GOTTLOB-MCHUGH, S. G., M. LEVESQUE, K. MACKENZIE, M. OLSON, O. YAROSH *et al.*, 1990 Organization of the 5S rRNA genes in the soybean Glycine max (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. Genome **33:** 486-494.

GRIFFIN, D., W. T. PENBERTHY, H. LUM, R. W. STEIN and W. L. TAYLOR, 2003 Isolation of the B3 transcription factor of the Xenopus TFIIIA gene. Gene **313:** 179-188.

GUDDAT, U., A. H. BAKKEN and T. PIELER, 1990 Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. Cell **60:** 619-628.

HALL, R. K., and W. L. TAYLOR, 1989 Transcription factor IIIA gene expression in Xenopus oocytes utilizes a transcription factor similar to the major late transcription factor. Mol Cell Biol **9:** 5003-5011.

HALLENBERG, C., J. NEDERBY NIELSEN and S. FREDERIKSEN, 1994 Characterization of 5S rRNA genes from mouse. Gene **142:** 291-295.

HAMADA, M., A. L. SAKULICH, S. B. KODURU and R. J. MARAIA, 2000 Transcription termination by RNA polymerase III in fission yeast. A genetic and biochemically tractable model system. J Biol Chem **275:** 29076-29081.

HAMMOND, M. C., A. WACHTER and R. R. BREAKER, 2009 A plant 5S ribosomal RNA mimic regulates alternative splicing of transcription factor IIIA pre-mRNAs. Nat Struct Mol Biol **16:** 541-549.

HANAS, J. S., J. R. HOCKER, Y. G. CHENG, M. R. LERNER, D. J. BRACKETT *et al.*, 2002 cDNA cloning, DNA binding, and evolution of mammalian transcription factor IIIA. Gene **282:** 43-52.

HAYES, J., T. D. TULLIUS and A. P. WOLFFE, 1989 A protein-protein interaction is essential for stable complex formation on a 5 S RNA gene. J Biol Chem **264:** 6009-6012.

HAYES, J. J., and K. R. CLEMENS, 1992 Locations of contacts between individual zinc fingers of Xenopus laevis transcription factor IIIA and the internal control region of a 5S RNA gene. Biochemistry **31:** 11600-11605.

HAYES, J. J., and T. D. TULLIUS, 1992 Structure of the TFIIIA-5 S DNA complex. J Mol Biol **227:** 407-417.

HE, X. J., Y. F. HSU, S. ZHU, A. T. WIERZBICKI, O. PONTES *et al.*, 2009 An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. Cell **137:** 498-508.

HERNANDEZ, N., 1993 TBP, a universal eukaryotic transcription factor? Genes Dev **7:** 1291-1308.

HERR, A. J., M. B. JENSEN, T. DALMAY and D. C. BAULCOMBE, 2005 RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. Science **308:** 118-120.

HOLDSWORTH, M. J., W. E. FINCH-SAVAGE, P. GRAPPIN and D. JOB, 2008 Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. Trends Plant Sci **13:** 7-13.

HOLMBERG, L., and O. NYGARD, 2000 Release of ribosome-bound 5S rRNA upon cleavage of the phosphodiester bond between nucleotides A54 and A55 in 5S rRNA. Biol Chem **381:** 1041-1046.

HSIEH, Y. J., T. K. KUNDU, Z. WANG, R. KOVELMAN and R. G. ROEDER, 1999 The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. Mol Cell Biol **19:** 7697-7704.

HUBER, P. W., J. P. RIFE and P. B. MOORE, 2001 The structure of helix III in Xenopus oocyte 5 S rRNA: an RNA stem containing a two-nucleotide bulge. J Mol Biol **312:** 823-832.

IDE, S., T. MIYAZAKI, H. MAKI and T. KOBAYASHI, 2010 Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. Science **327:** 693-696.

JARRY, B., and R. ROSSET, 1971 Heterogeneity of 5S RNA in Escherichia coli. Mol Gen Genet **113:** 43-50.

JOAZEIRO, C. A., G. A. KASSAVETIS and E. P. GEIDUSCHEK, 1994 Identical components of yeast transcription factor IIIB are required and sufficient for transcription of TATA box-containing and TATA-less genes. Mol Cell Biol **14:** 2798-2808.

JOHO, K. E., M. K. DARBY, E. T. CRAWFORD and D. D. BROWN, 1990 A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in Xenopus. Cell **61:** 293-300.

KANDOLF, H., 1994 The H1A histone variant is an in vivo repressor of oocyte-type 5S gene transcription in Xenopus laevis embryos. Proc Natl Acad Sci U S A **91:** 7257-7261.

KANNO, T., B. HUETTEL, M. F. METTE, W. AUFSATZ, E. JALIGOT *et al.*, 2005 Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. Nat Genet **37:** 761-765.

KANTIDAKIS, T., B. A. RAMSBOTTOM, J. L. BIRCH, S. N. DOWDING and R. J. WHITE, 2010 mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. Proc Natl Acad Sci U S A **107:** 11823-11828.

KASSAVETIS, G. A., B. BARTHOLOMEW, J. A. BLANCO, T. E. JOHNSON and E. P. GEIDUSCHEK, 1991 Two essential components of the Saccharomyces cerevisiae transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. Proc Natl Acad Sci U S A **88:** 7308-7312.

KASSAVETIS, G. A., B. R. BRAUN, L. H. NGUYEN and E. P. GEIDUSCHEK, 1990 S. cerevisiae TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. Cell **60:** 235-245.

KASSAVETIS, G. A., C. A. JOAZEIRO, M. PISANO, E. P. GEIDUSCHEK, T. COLBERT *et al.*, 1992 The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIIB. Cell **71:** 1055-1064.

KASSAVETIS, G. A., G. A. LETTS and E. P. GEIDUSCHEK, 2001 The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB participates in two steps of promoter opening. EMBO J **20:** 2823-2834.

KAULEN, H., P. POGNONEC, P. D. GREGOR and R. G. ROEDER, 1991 The Xenopus B1 factor is closely related to the mammalian activator USF and is implicated in the developmental regulation of TFIIIA gene expression. Mol Cell Biol **11:** 412-424.

KELLER, H. J., P. J. ROMANIUK and J. M. GOTTESFELD, 1992 Interaction of Xenopus TFIIIC with the TFIIIA.5 S RNA gene complex. J Biol Chem **267:** 18190-18198.

KLOETZEL, P. M., W. WHITFIELD and J. SOMMERVILLE, 1981 Analysis of reconstruction of an RNP particle which stores 5S RNA and tRNA in amphibian oocytes. Nucleic Acids Res **9:** 605-621.

KMIEC, E. B., and A. WORCEL, 1986 The positive transcription factor of the 5S RNA gene proteolyses during direct exchange between 5S DNA sites. J Cell Biol **103:** 673-681.

KOVELMAN, R., and R. G. ROEDER, 1992 Purification and characterization of two forms of human transcription factor IIIC. J Biol Chem **267:** 24446-24456.

KUNDU, T. K., Z. WANG and R. G. ROEDER, 1999 Human TFIIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. Mol Cell Biol **19:** 1605-1615.

LAFERTE, A., E. FAVRY, A. SENTENAC, M. RIVA, C. CARLES *et al.*, 2006 The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. Genes Dev **20:** 2030-2040.

LAREAU, L. F., A. N. BROOKS, D. A. SOERGEL, Q. MENG and S. E. BRENNER, 2007 The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. Adv Exp Med Biol **623:** 190-211.

LEWIS, B. P., R. E. GREEN and S. E. BRENNER, 2003 Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. Proc Natl Acad Sci U S A **100:** 189-192.

LIAO, X. B., K. R. CLEMENS, L. TENNANT, P. E. WRIGHT and J. M. GOTTESFELD, 1992 Specific interaction of the first three zinc fingers of TFIIIA with the internal control region of the Xenopus 5 S RNA gene. J Mol Biol **223:** 857-871.

MAO, J., B. APPEL, J. SCHAACK, S. SHARP, H. YAMADA *et al.*, 1982 The 5S RNA genes of Schizosaccharomyces pombe. Nucleic Acids Res **10:** 487-500.

MAO, X., and M. K. DARBY, 1993 A position-dependent transcription-activating domain in TFIIIA. Mol Cell Biol **13:** 7496-7506.

MAOR, R., A. JONES, T. S. NUHSE, D. J. STUDHOLME, S. C. PECK *et al.*, 2007 Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. Mol Cell Proteomics **6:** 601-610.

MARAIA, R. J., D. J. KENAN and J. D. KEENE, 1994 Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. Mol Cell Biol **14:** 2147-2158.

MARTIN, D. E., T. POWERS and M. N. HALL, 2006 Regulation of ribosome biogenesis: where is TOR? Cell Metab **4:** 259-260.

MASCIA, P. N., I. RUBENSTEIN, R. L. PHILLIPS, A. S. WANG and L. Z. XIANG, 1981 Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. Gene **15:** 7-20.

MATHIEU, O., Z. JASENCAKOVA, I. VAILLANT, A. V. GENDREL, V. COLOT *et al.*, 2003a Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. Plant Cell **15:** 2929-2939.

MATHIEU, O., Y. YUKAWA, J. L. PRIETO, I. VAILLANT, M. SUGIURA *et al.*, 2003b Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res **31:** 2424-2433.

MATHIEU, O., Y. YUKAWA, M. SUGIURA, G. PICARD and S. TOURMENTE, 2002 5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in Arabidopsis. Plant J **29:** 313-323.

MATSUMOTO, Y., and L. J. KORN, 1988 Upstream sequences required for transcription of the TFIIIA gene in Xenopus oocytes. Nucleic Acids Res **16:** 3801-3814.

MATZKE, M., T. KANNO, B. HUETTEL, L. DAXINGER and A. J. MATZKE, 2007 Targets of RNA-directed DNA methylation. Curr Opin Plant Biol **10:** 512-519.

MATZKE, M. A., and J. A. BIRCHLER, 2005 RNAi-mediated pathways in the nucleus. Nat Rev Genet **6:** 24-35.

MAYER, C., and I. GRUMMT, 2006 Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. Oncogene **25:** 6384-6391.

MCBRYANT, S. J., N. VELDHOEN, B. GEDULIN, A. LERESCHE, M. P. FOSTER *et al.*, 1995 Interaction of the RNA binding fingers of Xenopus transcription factor IIIA with specific regions of 5 S ribosomal RNA. J Mol Biol **248:** 44-57.

MILLER, J., A. D. MCLACHLAN and A. KLUG, 1985 Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. EMBO J **4:** 1609-1614.

MILNE, C. A., and J. SEGALL, 1993 Mapping regions of yeast transcription factor IIIA required for DNA binding, interaction with transcription factor IIIC, and transcription activity. J Biol Chem **268:** 11364-11371.

MITROVICH, Q. M., and P. ANDERSON, 2000 Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in C. elegans. Genes Dev **14:** 2173-2184.

MONTIJN, M. B., A. B. HOUTSMULLER, R. TEN HOOPEN, J. L. OUD and N. NANNINGA, 1999 The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in Petunia hybrida and Crepis capillaris. Chromosome Res **7:** 387-399.

MOQTADERI, Z., and K. STRUHL, 2004 Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in Saccharomyces cerevisiae reveals loci with incomplete transcription complexes. Mol Cell Biol **24:** 4118-4127.

MORTON, D. G., and K. U. SPRAGUE, 1984 In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. Proc Natl Acad Sci U S A **81:** 5519-5522.

MURATA, M., J. S. HESLOP-HARRISON and F. MOTOYOSHI, 1997 Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in Arabidopsis thaliana by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. Plant J **12:** 31-37.

NELSON, D. W., R. M. LINNING, P. J. DAVISON and B. M. HONDA, 1998 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes Caenorhabditis elegans and Caenorhabditis briggsae. Gene **218:** 9-16.

NI, J. Z., L. GRATE, J. P. DONOHUE, C. PRESTON, N. NOBIDA *et al.*, 2007 Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. Genes Dev **21:** 708-718.

NIELSEN, J. N., C. HALLENBERG, S. FREDERIKSEN, P. D. SORENSEN and B. LOMHOLT, 1993 Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. Nucleic Acids Res **21:** 3631-3636.

NISSEN, P., J. A. IPPOLITO, N. BAN, P. B. MOORE and T. A. STEITZ, 2001 RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. Proc Natl Acad Sci U S A **98:** 4899-4903.

NOMA, K., H. P. CAM, R. J. MARAIA and S. I. GREWAL, 2006 A role for TFIIIC transcription factor complex in genome organization. Cell **125:** 859-872.

OGILVIE, M. K., and J. S. HANAS, 1997 Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. Gene **203:** 103-112.

ONODERA, Y., J. R. HAAG, T. REAM, P. C. NUNES, O. PONTES *et al.*, 2005 Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. Cell **120:** 613-622.

ORI, N., Y. ESHED, G. CHUCK, J. L. BOWMAN and S. HAKE, 2000 Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. Development **127:** 5523-5532.

PAN, Q., O. SHAI, L. J. LEE, B. J. FREY and B. J. BLENCOWE, 2008 Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet **40:** 1413-1415.

PARSONS, M. C., and P. A. WEIL, 1990 Purification and characterization of Saccharomyces cerevisiae transcription factor TFIIIC. Polypeptide composition defined with polyclonal antibodies. J Biol Chem **265:** 5095-5103.

PAULE, M. R., and R. J. WHITE, 2000 Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Res **28:** 1283-1298.

PELHAM, H. R., and D. D. BROWN, 1980 A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **77:** 4170-4174.

PELHAM, H. R., W. M. WORMINGTON and D. D. BROWN, 1981 Related 5S RNA transcription factors in Xenopus oocytes and somatic cells. Proc Natl Acad Sci U S A **78:** 1760-1764.

PELISSIER, T., S. THALMEIR, D. KEMPE, H. L. SANGER and M. WASSENEGGER, 1999 Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. Nucleic Acids Res **27:** 1625-1634.

PENBERTHY, W. T., D. GRIFFIN, R. K. HALL and W. L. TAYLOR, 2003 The Xenopus B2 factor involved in TFIIIA gene regulation is closely related to Sp1 and interacts in a complex with USF. Gene **305:** 205-215.

PENG, Z., and E. BATEMAN, 2004 Analysis of the 5S rRNA gene promoter from Acanthamoeba castellanii. Mol Microbiol **52:** 1123-1132.

PERLMANN, T., and O. WRANGE, 1991 Inhibition of chromatin assembly in Xenopus oocytes correlates with derepression of the mouse mammary tumor virus promoter. Mol Cell Biol **11:** 5259-5265.

PETERSON, R. C., J. L. DOERING and D. D. BROWN, 1980 Characterization of two xenopus somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. Cell **20:** 131-141.

PFAFF, S. L., R. K. HALL, G. C. HART and W. L. TAYLOR, 1991 Regulation of the Xenopus laevis transcription factor IIIA gene during oogenesis and early embryogenesis: negative elements repress the O-TFIIIA promoter in embryonic cells. Dev Biol **145:** 241-254.

PFAFF, S. L., and W. L. TAYLOR, 1992 Characterization of a Xenopus oocyte factor that binds to a developmentally regulated cis-element in the TFIIIA gene. Dev Biol **151:** 306-316.

PFAFF, S. L., and W. L. TAYLOR, 1998 Xenopus TFIIIA gene transcription is dependent on cis-element positioning and chromatin structure. Mol Cell Biol **18:** 3811-3818.

PHILIPPSEN, P., M. THOMAS, R. A. KRAMER and R. W. DAVIS, 1978 Unique arrangement of coding sequences for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in Saccharomyces cerevisiae as determined by R-loop and hybridization analysis. J Mol Biol **123:** 387-404.

PICARD, B., M. LE MAIRE, M. WEGNEZ and H. DENIS, 1980 Biochemical Research on oogenesis. Composition of the 42-S storage particles of Xenopus laevix oocytes. Eur J Biochem **109:** 359-368.

PIELER, T., B. APPEL, S. L. OEI, H. MENTZEL and V. A. ERDMANN, 1985a Point mutational analysis of the Xenopus laevis 5S gene promoter. EMBO J **4:** 1847-1853.

PIELER, T., J. HAMM and R. G. ROEDER, 1987 The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. Cell **48:** 91-100.

PIELER, T., S. L. OEI, J. HAMM, U. ENGELKE and V. A. ERDMANN, 1985b Functional domains of the Xenopus laevis 5S gene promoter. EMBO J **4:** 3751-3756.

PITTMAN, R. H., M. T. ANDREWS and D. R. SETZER, 1999 A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. J Biol Chem **274:** 33198-33201.

PLUTA, K., O. LEFEBVRE, N. C. MARTIN, W. J. SMAGOWICZ, D. R. STANFORD *et al.*, 2001 Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol **21:** 5031-5040.

PONDEL, M. D., S. MURPHY, L. PEARSON, C. CRADDOCK and N. J. PROUDFOOT, 1995 Sp1 functions in a chromatin-dependent manner to augment human alpha-globin promoter activity. Proc Natl Acad Sci U S A **92:** 7237-7241.

PONTES, O., C. F. LI, P. C. NUNES, J. HAAG, T. REAM *et al.*, 2006 The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. Cell **126:** 79-92.

PONTIER, D., G. YAHUBYAN, D. VEGA, A. BULSKI, J. SAEZ-VASQUEZ *et al.*, 2005 Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. Genes Dev **19:** 2030-2040.

PONTVIANNE, F., M. ABOU-ELLAIL, J. DOUET, P. COMELLA, I. MATIA *et al.*, 2010 Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet **6:** e1001225.

PONTVIANNE, F., I. MATIA, J. DOUET, S. TOURMENTE, F. J. MEDINA *et al.*, 2007 Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. Mol Biol Cell **18:** 369-379.

PROBST, A. V., F. SANTOS, W. REIK, G. ALMOUZNI and W. DEAN, 2007 Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. Chromosoma **116:** 403-415.

PUSCHENDORF, M., R. TERRANOVA, E. BOUTSMA, X. MAO, K. ISONO *et al.*, 2008 PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. Nat Genet **40:** 411-420.

QI, Y., X. HE, X. J. WANG, O. KOHANY, J. JURKA *et al.*, 2006 Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. Nature **443:** 1008-1012.

RANGASAMY, D., L. BERVEN, P. RIDGWAY and D. J. TREMETHICK, 2003 Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. EMBO J **22:** 1599-1607.

RANGWALA, S. H., and E. J. RICHARDS, 2004 The value-added genome: building and maintaining genomic cytosine methylation landscapes. Curr Opin Genet Dev **14:** 686-691.

RAUE, H. A., S. LORENZ, V. A. ERDMANN and R. J. PLANTA, 1981 Reconstitution of biologically active 50S ribosomal subunits with artificial 5S RNA molecules carrying disturbances in the base pairing within the molecular stalk. Nucleic Acids Res **9:** 1263-1269.

REINA, J. H., T. N. AZZOUZ and N. HERNANDEZ, 2006 Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. PLoS One **1:** e134.

REN, M., S. QIU, P. VENGLAT, D. XIANG, L. FENG *et al.*, 2011 Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. Plant Physiol **155:** 1367-1382.

REYNOLDS, W. F., and K. AZER, 1988 Sequence differences upstream of the promoters are involved in the differential expression of the Xenopus somatic and oocyte 5S RNA genes. Nucleic Acids Res **16:** 3391-3403.

RIGBY, P. W., 1993 Three in one and one in three: it all depends on TBP. Cell **72:** 7-10.

RINKE, J., and J. A. STEITZ, 1982 Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. Cell **29:** 149-159.

RO-CHOI, T. S., R. REDDY, D. HENNING and H. BUSCH, 1971 5S RNA 3 , a new nucleus-specific 5S RNA. Biochem Biophys Res Commun **44:** 963-972.

ROTHFELS, K., O. ROWLAND and J. SEGALL, 2007 Zinc fingers 1 and 7 of yeast TFIIIA are essential for assembly of a functional transcription complex on the 5 S RNA gene. Nucleic Acids Res **35:** 4869-4881.

ROWLAND, O., and J. SEGALL, 1996 Interaction of wild-type and truncated forms of transcription factor IIIA from Saccharomyces cerevisiae with the 5 S RNA gene. J Biol Chem **271:** 12103-12110.

ROWLAND, O., and J. SEGALL, 1998 A hydrophobic segment within the 81-amino-acid domain of TFIIIA from Saccharomyces cerevisiae is essential for its transcription factor activity. Mol Cell Biol **18:** 420-432.

SAKONJU, S., D. F. BOGENHAGEN and D. D. BROWN, 1980 A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. Cell **19:** 13-25.

SANDS, M. S., and D. F. BOGENHAGEN, 1991 The carboxyterminal zinc fingers of TFIIIA interact with the tip of helix V of 5S RNA in the 7S ribonucleoprotein particle. Nucleic Acids Res **19:** 1791-1796.

SCHMIDT, T., and J. S. HESLOP-HARRISON, 1993 Variability and evolution of highly repeated DNA sequences in the genus Beta. Genome **36:** 1074-1079.

SCHNEEBERGER, R. G., G. P. CREISSEN and C. A. CULLIS, 1989 Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, Linum usitatissimum. Gene **83:** 75-84.

SCHULMAN, D. B., and D. R. SETZER, 2002 Identification and characterization of transcription factor IIIA from Schizosaccharomyces pombe. Nucleic Acids Res **30:** 2772-2781.

SCOTTO, K. W., H. KAULEN and R. G. ROEDER, 1989 Positive and negative regulation of the gene for transcription factor IIIA in Xenopus laevis oocytes. Genes Dev **3:** 651-662.

SCRIPTURE, J. B., and P. W. HUBER, 1995 Analysis of the binding of Xenopus ribosomal protein L5 to oocyte 5 S rRNA. The major determinants of recognition are located in helix III-loop C. J Biol Chem **270:** 27358-27365.

SELKER, E. U., C. YANOFSKY, K. DRIFTMIER, R. L. METZENBERG, B. ALZNER-DEWEERD *et al.*, 1981 Dispersed 5S RNA genes in N. crassa: structure, expression and evolution. Cell **24:** 819-828.

SERA, T., and A. P. WOLFFE, 1998 Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on Xenopus oocyte 5S rRNA genes. Mol Cell Biol **18:** 3668-3680.

SETZER, D. R., and D. D. BROWN, 1985 Formation and stability of the 5 S RNA transcription complex. J Biol Chem **260:** 2483-2492.

SHARP, S. J., and A. D. GARCIA, 1988 Transcription of the Drosophila melanogaster 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements. Mol Cell Biol **8:** 1266-1274.

SIMMS, T. A., S. L. DUGAS, J. C. GREMILLION, M. E. IBOS, M. N. DANDURAND *et al.*, 2008 TFIIIC binding sites function as both heterochromatin barriers and chromatin insulators in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell **7:** 2078-2086.

SIMS, M. A., J. L. DOERING and H. D. HOYLE, 1983 DNA methylation patterns in the 5S DNAs of Xenopus laevis. Nucleic Acids Res **11:** 277-290.

SMITH, D. R., I. J. JACKSON and D. D. BROWN, 1984 Domains of the positive transcription factor specific for the Xenopus 5S RNA gene. Cell **37:** 645-652.

SMITH, M. W., A. MESKAUSKAS, P. WANG, P. V. SERGIEV and J. D. DINMAN, 2001 Saturation mutagenesis of 5S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol **21:** 8264-8275.

SMITH, R. C., E. DWORKIN-RASTL and M. B. DWORKIN, 1988 Expression of a histone H1-like protein is restricted to early Xenopus development. Genes Dev **2:** 1284-1295.

SOPPE, W. J., Z. JASENCAKOVA, A. HOUBEN, T. KAKUTANI, A. MEISTER *et al.*, 2002 DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. EMBO J **21:** 6549-6559.

SORENSEN, P. D., and S. FREDERIKSEN, 1991 Characterization of human 5S rRNA genes. Nucleic Acids Res **19:** 4147-4151.

SRINIVASAN, L., and K. P. GOPINATHAN, 2002 Characterization of RNA polymerase III transcription factor TFIIIC from the mulberry silkworm, Bombyx mori. Eur J Biochem **269:** 1780-1789.

SRIVASTAVA, M., and H. B. POLLARD, 1999 Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. FASEB J **13:** 1911-1922.

STEITZ, J. A., C. BERG, J. P. HENDRICK, H. LA BRANCHE-CHABOT, A. METSPALU *et al.*, 1988 A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. J Cell Biol **106:** 545-556.

SUN, Y., Q. ZHOU, W. ZHANG, Y. FU and H. HUANG, 2002 ASYMMETRIC LEAVES1, an Arabidopsis gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves. Planta **214:** 694-702.

TESSADORI, F., M. C. CHUPEAU, Y. CHUPEAU, M. KNIP, S. GERMANN *et al.*, 2007a Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated Arabidopsis cells. J Cell Sci **120:** 1200-1208.

TESSADORI, F., R. K. SCHULKES, R. VAN DRIEL and P. FRANSZ, 2007b Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. Plant J **50:** 848-857.

TESSADORI, F., R. VAN DRIEL and P. FRANSZ, 2004 Cytogenetics as a tool to study gene regulation. Trends Plant Sci **9:** 147-153.

THEUNISSEN, O., F. RUDT, U. GUDDAT, H. MENTZEL and T. PIELER, 1992 RNA and DNA binding zinc fingers in Xenopus TFIIIA. Cell **71:** 679-690.

THEUNISSEN, O., F. RUDT and T. PIELER, 1998 Structural determinants in 5S RNA and TFIIIA for 7S RNP formation. Eur J Biochem **258:** 758-767.

TOMASZEWSKI, R., and A. JERZMANOWSKI, 1997 The AT-rich flanks of the oocyte-type 5S RNA gene of Xenopus laevis act as a strong local signal for histone H1-mediated chromatin reorganization in vitro. Nucleic Acids Res **25:** 458-466.

TOMASZEWSKI, R., E. MOGIELNICKA and A. JERZMANOWSKI, 1998 Both the 5S rRNA gene and the AT-rich flanks of xenopus laevis oocyte-type 5S rDNA repeat are required for histone H1-dependent repression of transcription of pol III-type genes in in vitro reconstituted chromatin. Nucleic Acids Res **26:** 5596-5601.

TSIATSIANI, L., K. GEVAERT and F. VAN BREUSEGEM, 2011 Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? Physiol Plant.

TSUBUKI, S., H. KAWASAKI, Y. SAITO, N. MIYASHITA, M. INOMATA *et al.*, 1993 Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. Biochem Biophys Res Commun **196:** 1195-1201.

TUTOIS, S., C. CLOIX, C. CUVILLIER, M. C. ESPAGNOL, J. LAFLEURIEL *et al.*, 1999 Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of Arabidopsis thaliana. Chromosome Res **7:** 143-156.

TUTOIS, S., C. CLOIX, O. MATHIEU, C. CUVILLIER and S. TOURMENTE, 2002 Analysis of 5S rDNA Loci among Arabidopsis Ecotypes and Subspecies. Genome Letters **1**.

UPADHYA, R., J. LEE and I. M. WILLIS, 2002 Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. Mol Cell **10:** 1489-1494.

VAILLANT, I., 2006 Etude des régulations génétiques et épigénétiques de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis thaliana, pp. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

VAILLANT, I., I. SCHUBERT, S. TOURMENTE and O. MATHIEU, 2006 MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. EMBO Rep **7:** 1273-1278.

VAILLANT, I., S. TUTOIS, C. CUVILLIER, I. SCHUBERT and S. TOURMENTE, 2007 Regulation of Arabidopsis thaliana 5S rRNA Genes. Plant Cell Physiol **48:** 745-752.

VAILLANT, I., S. TUTOIS, Z. JASENCAKOVA, J. DOUET, I. SCHUBERT *et al.*, 2008 Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in Arabidopsis. Plant J **54:** 299-309.

VALENZUELA, L., N. DHILLON and R. T. KAMAKAKA, 2009 Transcription independent insulation at TFIIIC-dependent insulators. Genetics **183:** 131-148.

VAN CAMPENHOUT, S., R. AERT and G. VOLCKAERT, 1998 Orthologous DNA sequence variation among 5S ribosomal RNA gene spacer sequences on homoeologous chromosomes 1B, 1D, and 1R of wheat and rye. Genome **41:** 244-255.

VAN DER HOORN, R. A., 2008 Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annu Rev Plant Biol **59:** 191-223.

VENKATESWARLU, K., S. W. LEE and R. N. NAZAR, 1991 Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. Gene **105:** 249-254.

VICIENT, C. M., and M. DELSENY, 1999 Isolation of total RNA from Arabidopsis thaliana seeds. Anal Biochem **268:** 412-413.

VONGS, A., T. KAKUTANI, R. A. MARTIENSSEN and E. J. RICHARDS, 1993 Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. Science **260:** 1926-1928.

VRANA, K. E., M. E. CHURCHILL, T. D. TULLIUS and D. D. BROWN, 1988 Mapping functional regions of transcription factor TFIIIA. Mol Cell Biol **8:** 1684-1696.

WAGNER, I., and I. CAPESIUS, 1981 Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. Biochim Biophys Acta **654:** 52-56.

WANG, B. B., M. O'TOOLE, V. BRENDEL and N. D. YOUNG, 2008 Cross-species EST alignments reveal novel and conserved alternative splicing events in legumes. BMC Plant Biol **8:** 17.

WANG, C. K., and P. A. WEIL, 1989 Purification and characterization of Saccharomyces cerevisiae transcription factor IIIA. J Biol Chem **264:** 1092-1099.

WARRENER, P., and R. PETRYSHYN, 1991 Phosphorylation and proteolytic degradation of nucleolin from 3T3-F442A cells. Biochem Biophys Res Commun **180:** 716-723.

WEI, Y., C. K. TSANG and X. F. ZHENG, 2009 Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. EMBO J **28:** 2220-2230.

WESTMARK, C. J., R. GHOSE and P. W. HUBER, 2002 Phosphorylation of Xenopus transcription factor IIIA by an oocyte protein kinase CK2. Biochem J **362:** 375-382.

WHITE, R. J., 2005 RNA polymerases I and III, growth control and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol **6:** 69-78.

WHITE, R. J., P. W. RIGBY and S. P. JACKSON, 1992 The TATA-binding protein is a general transcription factor for RNA polymerase III. J Cell Sci Suppl **16:** 1-7.

WIERZBICKI, A. T., J. R. HAAG and C. S. PIKAARD, 2008 Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. Cell **135:** 635-648.

WILDEMAN, A. G., and R. N. NAZAR, 1982 Structural studies of 5 S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus. A comparison of generalized models for eukaryotic 5 S RNAs. J Biol Chem **257:** 11395-11404.

WILSON, D. N., and K. H. NIERHAUS, 2003 The ribosome through the looking glass. Angew Chem Int Ed Engl **42:** 3464-3486.

WIMBER, D. E., and D. M. STEFFENSEN, 1970 Localization of 5S RNA genes on Drosophila chromosomes by RNA-DNA hybridization. Science **170:** 639-641.

WOLFFE, A. P., 1989 Dominant and specific repression of Xenopus oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. EMBO J **8:** 527-537.

WOLFFE, A. P., and D. D. BROWN, 1988 Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. Science **241:** 1626-1632.

WOODLAND, H. R., J. M. FLYNN and A. J. WYLLIE, 1979 Utilization of stored mRNA in Xenopus embryos and its replacement by newly synthesized transcripts: histone H1 synthesis using interspecies hybrids. Cell **18:** 165-171.

WORMINGTON, W. M., D. F. BOGENHAGEN, E. JORDAN and D. D. BROWN, 1981 A quantitative assay for Xenopus 5S RNA gene transcription in vitro. Cell **24:** 809-817.

WYSZKO, E., and M. BARCISZEWSKA, 1997 Purification and characterization of transcription factor IIIA from higher plants. Eur J Biochem **249:** 107-112.

WYSZKO, E., M. RADLOWSKI, S. BARTKOWIAK and M. Z. BARCISZEWSKA, 1997 Maize TF IIIA--the first transcription factor IIIA from monocotyledons. Purification and properties. Acta Biochim Pol **44:** 579-589.

XIE, Z., L. K. JOHANSEN, A. M. GUSTAFSON, K. D. KASSCHAU, A. D. LELLIS *et al.*, 2004 Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol **2:** E104.

YANG, Z., and J. J. HAYES, 2003 Xenopus transcription factor IIIA and the 5S nucleosome: development of a useful in vitro system. Biochem Cell Biol **81:** 177-184.

YOINE, M., M. A. OHTO, K. ONAI, S. MITA and K. NAKAMURA, 2006 The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. Plant J **47:** 49-62.

YOSHINAGA, S. K., N. D. L'ETOILE and A. J. BERK, 1989 Purification and characterization of transcription factor IIIC2. J Biol Chem **264:** 10726-10731.

YOUNG, L., R. L. JERNIGAN and D. G. COVELL, 1994 A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. Protein Sci **3:** 717-729.

ZANG, W. Q., and P. J. ROMANIUK, 1995 Characterization of the 5 S RNA binding activity of Xenopus zinc finger protein p43. J Mol Biol **245:** 549-558.

ZARAGOZA, D., A. GHAVIDEL, J. HEITMAN and M. C. SCHULTZ, 1998 Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. Mol Cell Biol **18:** 4463-4470.

ZHANG, P. G., S. Z. HUANG, A. L. PIN and K. L. ADAMS, 2010 Extensive divergence in alternative splicing patterns after gene and genome duplication during the evolutionary history of Arabidopsis. Mol Biol Evol **27:** 1686-1697.

ZILBERMAN, D., X. CAO and S. E. JACOBSEN, 2003 ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science **299:** 716-719.

Annexes

Regulation of Pol I-Transcribed 45S rDNA and Pol III- Transcribed 5S rDNA in Arabidopsis

Layat E., Sáez-Vásquez J., Tourmente S.

Plant and Cell Physiology Advance Access published December 14, 2011

Running Title: 5S and 45S ribosomal genes

Corresponding author: Sylvette Tourmente, Université Blaise Pascal, 24, avenue des Landais, GReD, BP 80026, 63171 AUBIERE cedex, FRANCE

Tel : +33 4 73 40 74 01

Fax number : +33 4 73 40 77 77

E-mail: sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr

Subject areas: (3) Regulation of gene expression (10) genomics

Number of colour figures : 2

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

ABSTRACT

The ribosomal RNAs 18S, 5.8S and 25S, which result from the 45S precursor, together with 5S rRNAs, are central components of the ribosome. The integration of one molecule of each ribosomal RNA per ribosome necessitates an elaborate coordination between transcriptions of the two ribosomal DNA (rDNA) families. Even though 5S rDNA is transcribed by RNA polymerase III and 45S rDNA by RNA polymerase I, the two ribosomal DNA families present certain similarities in their transcriptional regulation. This review aims to compare 5S and 45S ribosomal RNA genes in the plant model *Arabidopsis thaliana* in terms of organization, transcription and regulation, and draws parallels between the two rDNA families.

Keywords: Arabidopsis, 5S ribosomal DNA, 45S ribosomal DNA, Transcriptional Regulation

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Introduction

Biosynthesis of ribosomes monopolizes up to 80% of the cellular transcription activity**.** Ribosome biogenesis in eukaryotic cells requires the concerted synthesis of RNAs by three nuclear RNA polymerases. RNA polymerase II (Pol II) produces mRNAs that encode ribosomal proteins. The genes encoding the 5.8S, 18S and 25S ribosomal RNAs, known as 45S ribosomal DNA (rDNA) in plants are transcribed in the nucleolus by RNA polymerase I (Pol I), while 5S ribosomal RNAs are transcribed by RNA polymerase III (Pol III). Ribosomal RNAs (rRNA) associate with around 80 proteins to form the 40S and 60S ribosomal subunits (Figure 1A) (Korostelev and Noller 2007). Since one molecule of each ribosomal RNA is integrated in a ribosome, stoechiometric amounts of rRNA need to be produced which requires a tight coordination between synthesis of the RNA and protein moieties of the ribosome (Laferte et al. 2006).

This review aims to compare 5S and 45S ribosomal RNA genes (named 5S and 45S genes in this review) in the plant model *Arabidopsis thaliana* in terms of organization, transcription and regulation, and illustrates the similarities between the two rDNA families.

Structure and localization of 5S and 45S ribosomal RNA genes

The *Arabidopsis thaliana* genome contains approximately 1000 copies of 5S genes per haploid genome, which are arranged in tandem arrays located within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 in the Columbia accession (Figures 1B and 2) (Campell et al. 1992). A typical 5S rDNA unit is 500 bp-long and consists of a 120 bp transcribed sequence, with an internal promoter and an approximately 380 bp intergenic spacer. Transcription by Pol III gives rise to a 120 nt 5S rRNA (Cloix et al. 2002) which is integrated into the large subunit of the ribosome. Its transcription requires the 5S rDNA-specific transcription factor IIIA (TFIIIA) which binds to the internal promoter composed of three conserved elements Box A, Intermediate Element and Box C (Bogenhagen et al. 1980;

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Cloix et al. 2000). The Arabidopsis internal promoter shows high sequence similarity with the one in Xenopus 5S RNA genes (Bogenhagen et al. 1980; Cloix et al. 2000).

The 45S genes are tandemly repeated at nucleolar organizer regions (NORs), termed as such because the nucleolus, the site of ribosome synthesis, is organized around rRNA genes during interphase (Lam et al. 2005; Shaw and Doonan 2005). Around 570-750 copies of 45S genes per haploid genome are arranged in head to tail tandem arrays located at the tips of the short arms of chromosomes 2 and 4 (NOR 2 and 4) in Arabidopsis (Figure 1B) (Copenhaver et al. 1995; Copenhaver and Pikaard 1996). Each rRNA gene transcription unit is ~10 kb-long and consists of sequences encoding a precursor transcript that includes the structural rRNAs (18S, 5.8S, 25S), the Internal Transcribed Spacers (ITS) and the External Transcribed Spacers (ETS) (Figure 2). The rRNA gene units are separated from the adjacent gene in the array by an Inter Genic Spacer (IGS) (Sáez-Vásquez and Echeverria 2006). Transcription by Pol I gives rise to a precursor or pre-rRNA, which is then processed into the 18S, 5.8S and 25S rRNA mature forms (Gruendler et al. 1991; Gruendler et al. 1989; Unfried et al. 1989), integrated in the ribosome (Figure 1A). Transcription starts from the promoter localized in the IGS. The sequences extending from –55 upstream to +6 downstream from the transcription start site (+1) are sufficient to program minimal and accurate Pol I transcription initiation in *A. thaliana* (Doelling et al. 1993; Doelling and Pikaard 1995). Nucleolin, a nucleolar protein, plays a role in Pol I transcription and processing of 45S pre-rRNA (Gaume et al. 2011; Mongelard and Bouvet 2007).

In Arabidopsis, 5S and 45S arrays are physically separated. Wicke et al. (2011) recently reported that the physical linkage of all rRNA genes observed in streptophyte algae, mosses and lycophytes may be regarded as the ancestral state of rDNA organization within land plants.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Only some of the ribosomal DNA loci are active

Eukaryotes contain thousands of rRNA genes, and it has been believed that the number of these genes far exceeds the number expected to be required to supply ample cytoplasmic rRNA (Rogers and Bendich 1987) and excess copies are transcriptionally repressed. Indeed, heterochromatic chromocenters (CC), that can easily be observed as bright DAPI-positive domains with fluorescence microscopy (Figure 2), and which are sites where heterochromatin coalesces (Fransz et al. 2002), include centromeric repeats, other heterochromatic repeats and silent rRNA genes (Costa-Nunes et al. 2010). From these observations, the following questions arose: what distinguishes active and silent rRNA genes, do they differ in primary sequence and how is their differential regulation achieved?

In the *A. thaliana* Columbia accession, only two 5S rDNA arrays are transcribed. *In vivo* and *in vitro* results failed to show expression of the 5S genes from chromosome 3 and from the small locus of chromosome 5. Only 5S genes from chromosome 4 and from the large locus on chromosome 5 are expressed (Figure 1B) (Cloix et al. 2002; Cloix et al. 2003).

Selective activation of ribosomal DNA variants

In addition to the presence of silent rDNA loci, the active loci themselves contain transcribed and repressed rRNA genes. Indeed, variants of both 5S and 45S genes have been identified in the genome of *A. thaliana*. These gene variants show length or sequence heterogeneity.

Both active 5S-repeat clusters, on chromosome 4 and the left arm of chromosome 5 in the Columbia accession, contain transcribed and repressed 5S genes. In most of the tissues from adult wild-type plants, only major 5S genes are expressed whereas minor/heterogenous genes, which diverge from major ones from one up to several nucleotides, are repressed (Mathieu et al. 2003a). The terms major and minor/heterogenous refer to the transcriptional activity. While major 5S genes contribute majorly to the 5S rRNA pool as opposed to the minor ones,

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

they only represent 20% of the 5S genes in both active 5S-repeat clusters. This illustrates that only a fraction of the 5S genes is actually expressed. However, in the seed, a tissue in which large quantities of 5S rRNA accumulate, 5S rRNA heterogeneity is observed. Therefore, expression of the minor genes varies, depending on tissues and/or developmental stages, suggesting the existence of mechanisms which dictate the « on » and « off » state of the corresponding minor/heterogenous 5S genes.

Interestingly, 5S genes whose organization has been analyzed for the pericentromeric 5S locus on chromosome 5 are not randomly positioned along the 5S array. This analysis revealed an increasing number of mutations along the 5S locus (AGI 2000; Cloix et al. 2002; Vaillant et al. 2008). This suggests that 5S major genes, constitutively transcribed, reside at the euchromatic side of the 5S array. The most mutated 5S genes (containing 3 to 10 mutations in their coding sequence) at the centromere-proximal side of the 5S locus are repressed. Indeed, we never recovered 5S cDNA with more than 2 nucleotide substitutions among the thousands of 5S cDNA sequences we have analyzed (Tourmente, personal communication).

At least four 45S rDNA variants also exist in the Columbia accession. Sequencing analysis of 3'ETS sequences (Figure 2) indicates that *A. thaliana* contains three major 45S gene variants, *VAR1*, *VAR2* and *VAR3* representing respectively 48, 30 and 22% of total 45S genes, and the very low copy number *VAR4* (Pontvianne et al. 2010). Remarkably, *VAR2*, *3* and *4* are expressed in WT plants, however we do not know whether all copies are transcribed, whereas the most highly represented *VAR1* is inactive. However, *VAR1* is transcribed in germinating seeds or chromatin mutants (Pontvianne et al. 2010) demonstrating its transcription ability. This illustrates that only part of the 45S genes is expressed. Whether these variants localize to NOR2 and/or NOR4 is currently unknown.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Taken together, for both rDNA families, some DNA variants are selectively activated while others are repressed. This raises the question of the biological relevance of these gene variants in the Arabidopsis genome.

In yeast, inactive ribosomal RNA genes are required as a landing platform for cohesion complexes and in this way they help to ensure genetic stability of the ribosomal locus (Ide et al. 2010). We also observed that a large fraction of 5S and 45S genes is never transcribed. Therefore, a similar role for the rDNA loci in genome stability can also be envisaged in Arabidopsis.

Loops of active, euchromatic, 5S and 45S genes

The work of Fransz et al. (2002) revealed a relatively simple organization of chromosomes within Arabidopsis nuclei with chromosome territories consisting of a single repeat-rich, heterochromatic CC, from which gene-rich, euchromatic loops emanate. The presence of transcribed and repressed rRNA genes inside a locus implies differential regulation acting at these two genes fractions. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed that a large fraction of 5S rDNA colocalizes with heterochromatin whereas another fraction forms loops that emanate from the heterochromatic CC in leaf nuclei (Figure 2) (Mathieu et al. 2003a). Since only major 5S rRNA was recovered in this tissue, the transcribed major 5S genes presumably reside in the 5S loops whereas the fraction residing in the heterochromatic CC is considered silent. Coherently, immunosignals obtained with antibodies directed against dimethylated lysine 9 of histone H3 (H3K9me2), a repressive mark, are clustered at the CC. 5S rDNA loops are less labeled with H3K9me2, and enriched for histone H3 acetylated at lysine 9 and methylated at lysine 4 suggesting a euchromatic structure permissive for transcription (Mathieu et al. 2003a).

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

The nucleolus is a substructure that results from expression of 45S genes. It is formed around the NORs during transcription by Pol I (Figure 2) (Saez-Vasquez and Medina 2008). Indeed, a loop of decondensed 45S rDNA repeats that originates from the NOR has been observed in the nucleolus (Probst et al. 2004). Excess, inactive 45S genes are highly condensed and sequestered in heterochromatin at the external periphery of the nucleolus (Raska et al. 2004; Saez-Vasquez and Medina 2008; Shaw and Jordan 1995).

These results provide evidence that for both rDNA families, a fraction of the genes "escapes" from heterochromatin to be transcribed.

Transcription by Pol I but also maturation steps of the precursor are performed in the nucleolus. There is now extensive evidence of 5S gene clusters at chromosomal locations distant from the 45S rDNA that preferentially associate with the nucleolus or nucleolar periphery (Haeusler and Engelke 2006; Montijn et al. 1999). Whether this is the case in Arabidopsis merits investigation.

Nucleolar dominance and repression of ribosomal RNA genes are mediated by epigenetic mechanisms

As reported above, the repression of rRNA genes is mediated by a heterochromatic structure in Arabidopsis. DNA in heterochromatin is heavily methylated and contains repressive histones marks.

One of the earliest recognized epigenetic phenomena, nucleolar dominance describes the transcription of 45S genes inherited from only one parent in genetic hybrids. The phenomenon is widespread, occuring in insects, amphibians, mammals and plants (reviewed in McStay 2006; Tucker et al. 2010). Therefore, nucleolus forms around rRNA genes inherited from only one progenitor, whereas the other progenitor's rRNA genes are silent (Chen and Pikaard 1997). Nucleolar dominance has been well described in *Arabidopsis*

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

suecica, the allotetraploid hybrid of *A. thaliana* and *A. arenosa* (Chen et al. 1998). In this hybrid, the entire *A. thaliana*-derived NORs are selectively silenced, enriched for the heterochromatic mark H3K9me2 and depleted for the euchromatic mark H3K4me3. However, only a subset of the dominant *A. arenosa* 45S genes is active, decondensed and associated with H3K4me3 whereas the remaining excess, inactive fraction is heterochromatic and associated with H3K9me2 (Lawrence et al. 2004). HDT1 and HDA6, two histone deacetylases and DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) a *de novo* methyltransferase, are required to maintain DNA hypermethylation at the promoters of silenced genes, whereas acetylated histones H3K9, H3K14 and tetra-acetylated histone H4 (K5, K8, K12 and K16) are associated with active promoters whose cytosines are hypomethylated (Earley et al. 2006; Lawrence et al. 2004). RNAi-mediated knockdown of RDR2 (RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2), DCL3 (DICER like protein) or DRM2, components of the RdDM (RNA-directed DNA methylation) pathway (Matzke et al. 2009), disrupts the silencing of the *A. thaliana*-derived rRNA genes in *A. suecica.* RNAi mediated knockdown of MBD (Methylcytosine Biding Domain) protein genes revealed that MBD6 and MBD10 are also required for *A. thaliana*-derived rRNA gene silencing in *A. suecica.* In agreement with these results, small RNAs corresponding to the rRNA gene promoter and intergenic regions are eliminated in DCL3-RNAi lines and are depleted in RDR2-RNAi plants, suggesting a role for the siRNAs in the selective silencing of *A. thaliana*-derived rRNA genes (Costa-Nunes et al. 2010; Preuss et al. 2008; Tucker et al. 2010).

Interestingly, when silent *A. thaliana*-derived rRNA genes subjected to nucleolar dominance are derepressed with aza-dC (an inhibitor of DNA methylation) or TSA (histone deacetylase inhibitor), or by knockdown of required chromatin modifying activities, transcription of the dominant set of *A. arenosa* rRNA genes also increases (Chen et al. 1998; Lawrence et al. 2004; Preuss et al. 2008). This suggests that the mechanisms responsible for the silencing of

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

the underdominant genes are also silencing the subset of the dominant rRNA genes and that nucleolar dominance is a manifestation of dosage control. However, there are probably additional regulatory mechanisms. Indeed, knockdown of DDM1, which affects rDNA methylation, does not release silencing of both *A. thaliana*-derived and *A. arenosa*-derived rRNA genes in *A. suecica* (Preuss et al. 2008).

Such a dominance mechanism might also apply to 5S rDNA loci. However, the sequence of the transcribed region of 5S rDNA units is highly conserved between accessions and subspecies, preventing the analysis of a "potential 5S dominance" (Tutois et al. 2002).

In nonhybrid *Arabidopsis thaliana*, the RdDM silencing pathway (Herr et al. 2005; Kanno et al. 2005; Onodera et al. 2005; Pontier et al. 2005; Zhang et al. 2007) which mediates *de novo* DNA methylation at asymmetrical CHH sites (Huettel et al. 2007; Wassenegger 2000, 2005) participates to 5S and 45S genes repression involved in dosage control (Blevins et al. 2009; Douet et al. 2008; Douet et al. 2009; Earley et al. 2006; Preuss et al. 2008). The following section presents the common principles in transcriptional repression between 5S and 45S rDNA.

Earley et al. (2010) analysed the molecular basis for 45S rDNA repression in *A. thaliana*. In *hda6* mutants, symmetric methylation at CG/CNG motifs is reduced (Earley et al. 2010). Surprisingly, spurious Pol II transcription occurs throughout the intergenic spacers. The resulting sense and antisense spacer transcripts facilitate a massive overproduction of siRNA diced by two DICER proteins (DCL3 and DCL4) of the RdDM pathway that, in turn, direct *de novo* asymmetric cytosine methylation to the corresponding gene sequences. However, the resulting *de novo* DNA methylation fails to suppress Pol I or Pol II transcription in the absence of HDA6 activity, and euchromatic histone modifications typical of active genes, such as histone H3 acetylation and K4 methylation, accumulate. As a result, 45S rDNA is decompacted and the 45S gene variant (*VAR1*), normally inactivated, becomes transcribed.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

The results obtained for 5S rDNA allow to propose an analogous model of repression, coherent with the stoichiometric needs of 5S and 45S rRNA.

In mutants for the maintenance METHYLTRANSFERASE1 (*met1-1*) and CHROMOMETHYLASE3 (*cmt3-7*), but also in seedlings treated with 5-aza C or in the mutant of the chromatin remodeling factor DDM1, symmetric methylation at CG/CNG motifs is reduced, and a silencing release of minor 5S genes is observed (Mathieu et al. 2003a; Vaillant et al. 2007). In addition, a particular set of transcripts, termed 5S-210, that extend into the intergenic spacer (IGS) downstream of 5S RNA genes overaccumulate in *met1* and *ddm1* mutants (Vaillant et al. 2006). These transcripts are the precursors of 5S siRNA and consequently 5S siRNA which match to the IGS overaccumulate (Blevins et al. 2009), leading to enhanced RdDM and increased *de novo* methylation (Blevins et al. 2009) mediated by DRM2 (Mathieu et al. 2007) in these mutants. However, despite the 5S rDNA asymmetrical hypermethylation in these mutants, 5S rDNA is hypomethylated at symmetrical cytosines leading to derepression of minor 5S genes. In absence of HDA6, symmetrical CNG methylation is decreased at 5S rDNA and a silencing release of minor 5S genes is observed (Vaillant et al. 2007).

All the results obtained for 5S and 45S rDNA show that a combination of maintenance symmetrical methylation patterns and *de novo* asymmetrical methylation patterns, mediated by the RdDM pathway, together with histone modifications, as for instance deacetylation performed by HDA6, help to ensure the correct 5S and 45S genes repression and therefore the correct gene dosage. In addition, in all the mentioned mutants, the total amount of mature rRNA was not significantly affected, at least in nonhybrid *Arabidopsis thaliana.* This agrees with idea that the 5S rDNA-specific TFIIIA is the limiting factor in 5S rDNA transcription

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

(Mathieu et al. 2003a) and suggests a redistribution of the Pol III complexes on the 5S genes (and eventually the Pol I complexes on 45S genes) in chromatin mutants.

A Pol V activity, RdDM- independent, drives compaction of both 5S and 45S rDNA

Each of the two 5S arrays from chromosome 4 and 5 is a target of RdDM, which contributes to the selective repression of genes. In mutants of the RdDM pathway, such as *nrpd1* (Pol IV subunit), *rdr2, drm2, ago4* or *dcl3*, a reduction of asymmetric methylation at each 5S array is associated with the derepression of minor/heterogenous 5S genes at chromosomes 4 and 5; however without 5S rDNA decompaction (Douet et al. 2009).

Interestingly, the 5S array from chromosome 4 (but not those from chromosomes 3 and 5) as well as NOR loci (45S rDNA) are decompacted in cotyledons of *nrpe1* and *nrpe5a*, mutants of two Pol V-specific subunits, illustrating another common regulation process of 5S and 45S rDNA. This decompaction is restricted to the Pol V–loss of function (Douet et al. 2009), specific to the 5S array from chromosome 4 and is not associated with changes of 5S rDNA asymmetric methylation. Indeed, this additional role of Pol V is Pol IV- and RdDM-independent and therefore adds an additional level of regulation. This suggests that an alternative pathway *i.e.* without Pol IV and RdDM partners exists to regulate organization and expression of 5S (at chromosome 4) and 45S rDNA loci. It also suggests that the Pol V complex might recruit other repressive epigenetic marks in addition to DNA methylation and H3K9me2 which is dependent on DNA methylation at CG sites (Mathieu et al. 2005).

Since there is a need in the plant kingdom for rapid, reversible changes in gene expression to respond to growth demands or environmental changes, some of the rDNA repeats may be specifically targeted for silencing as a mechanism to modulate or fine-tune total cellular rDNA activity.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Nucleolin controls 45S RNA gene transcription

The transcription of 45S rDNA by Pol I involves the transcription factor nucleolin which represents an additional layer of regulation (Figure 2).

In eukaryotes, nucleolin is one of the most abundant non-ribosomal proteins in the nucleus. Nucleolin plays a role in different steps of ribosome biogenesis, including Pol I transcription and processing of 45S pre-rRNA (Gaume et al. 2011; Mongelard and Bouvet 2007). In *Arabidopsis*, AtNUC-L1 (a nucleolin-like protein) localizes in the nucleolus and plays a role in 45S rDNA chromatin condensation and in controlling homeostatic rRNA gene expression (Pontvianne et al. 2007). For that, AtNUC-L1 specifically binds rRNA gene promoter sequences and directs rRNA transcription from the transcription initiation site (Pontvianne et al. 2007). To demonstrate that AtNUC-L1 interacts with transcriptionally active 45S genes, *hda6* mutants have been used (Pontvianne et al. 2010). In *hda6* plants, 45S rDNA chromatin decondensation induces expression of *VAR1* (normally repressed in WT plants). ChIP assays revealed a specific and direct interaction of AtNUC-L1 with 5' and 3' ETS sequences of *VAR1* in the *hda6* mutant only. However, AtNUC-L1 does not co-precipitate with Pol I subunits. Interestingly, AtNUC-L1 seems to be required for rDNA symmetric methylation of transcribed but not promoter sequences. Indeed, in *Atnuc-L1* plants methylation at CG (and in some extent at CHG) decreases specifically in the 5'ETS sequences (Pontvianne et al. 2010).

Considering the nucleosome remodeling activity of nucleolin proteins in mammals (Angelov et al. 2006; Erard et al. 1988; Kharrat et al. 1991), it is rational to propose that binding of AtNUC-L1 to rRNA genes may be required to position nucleosomes in specific transcriptional frames that determine the "on" or "off" state of rRNA genes. Many questions remain, including mutual dependency and complex crosstalk among nucleolin proteins and other functionally related protein factors, such as RdDM partners and HDA6.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Finally, in animals nucleolin localizes also in the nucleoplasm and might control Pol II transcription (Mongelard and Bouvet 2007). In Arabidopsis plants, the transcriptomal analysis of *Atnuc-L1* mutant revealed accumulation and/or reduction of the level of different transcripts transcribed by Pol II, including AtNUC-L2 (a second nucleolin-like protein) and other small RNA (Pontvianne et al. 2007). The *Atnuc-L1* mutant also showed a significantly reduced sugar-induced expression of ribosomal protein genes (Kojima et al. 2007). Therefore we can expect that nucleolin protein from plants might also control expression of Pol III genes. However to date whether or not Pol III transcription of 5S rRNA is affected in *Atnuc-L1* has not been established. Consequently, it will be interesting to determine whether the expression of major or minor/heterogenous 5S gene variants is modified in *Atnuc-L1*.

Transcriptional regulation of 5S RNA genes by TFIIIA

Transcription factor IIIA (TFIIIA) which was first isolated from Xenopus oocytes, contains nine zinc finger domains and is required for transcription of the 5S RNA gene by Pol III (Ginsberg et al. 1984). The protein binds specifically within the internal control region (ICR) of the 5S RNA gene and to the 5S RNA product. Zinc fingers 4 to 7 are responsible for the binding to 5S rRNA (Clemens et al. 1993) whereas fingers 1 to 3 are critical for the binding to the 3'-portion of the internal promoter (C-box element) of the Xenopus 5S gene (Clemens et al. 1992). In yeast, a second species where TFIIIA has been extensively studied, the ICR is a surprisingly short control region relative to the ICRs of Xenopus and Arabidopsis which are highly similar (Challice and Segall 1989; Cloix et al. 2000*)*. Later, the TFIIIA protein, present in every organism, has been characterized in several other species including *Arabidopsis thaliana* where it binds both 5S rDNA and 5S rRNA. It shows remarkably poor conservation of sequence (Mathieu et al. 2003b) and references therein) but except TFIIIA from *S. pombe*, which contains a tenth finger, all proteins analyzed carry nine C2H2-zinc fingers.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

The Arabidopsis TFIIIA gene consists of seven exons, the third of which results from a 5S RNA exonization in the gene that occured early in evolution of angiosperms. This exon, which bears considerable similarity in its secondary structure to plant 5S rRNA (Fu et al. 2009; Hammond et al. 2009), is alternatively skipped or included to produce either of the two transcript isoforms (Yoine et al. 2006). The ES (Exon-skipped) isoform encodes the fully functional TFIIIA protein. Instead, the EI (Exon-inclusion) isoform is eliminated by the NMD (nonsense mediated decay) pathway. Two groups (Fu et al. 2009; Hammond et al. 2009) proposed a post-transcriptional negative feedback auto-regulation model specific to plant TFIIIA genes. The model stipulates that when TFIIIA protein levels are low, the alternative exon is skipped, which results in an increase in the ES isoform and a consequent increase in production of new TFIIIA protein. When in abundance, a greater fraction of the TFIIIA transcripts is spliced into the unproductive isoform and then degraded through NMD, thereby downregulating TFIIIA production. Hammond et al. (2009) demonstrated that ribosomal protein L5 directly binds the 5S rRNA-like structure of the alternative exon, which parallels a known binding interaction between L5 and 5S rRNA (Szymanski et al. 2002). This binding promotes exon skipping and is expected to promote production of the TFIIIA protein.

This model stipulates a quantitative regulation of the 5S rRNA transcription by TFIIIA and illustrates the importance to control functional TFIIIA amounts in the cell. Given that during development the needs for 5S rRNAs vary considerably, e.g. they strongly accumulate in the seed, it will be interesting to test this model during plant development.

Post-germination chromatin remodeling of both 5S and 45S rDNA

The observation that the heterochromatin fraction in nuclei of cotyledons is much smaller at 2 day post-germination compared to 3 week-leaves provided evidence that chromatin is reorganized during development to obtain mature heterochromatin (Mathieu et al. 2003a).

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Investigation of the chromatin structure by FISH, revealed a large-scale reorganization of 5S rDNA chromatin during the first days of development, to obtain almost mature nuclei 5 days post-germination (Douet et al. 2008).

Similarly, FISH experiments revealed that 45S rDNA is decompacted in nuclei of 2 day-germinating seeds (Pontvianne et al. 2010), illustrating that 45S rDNA chromatin also reorganizes during post-germination. Interestingly, the progressive chromatin reorganization during the post-germination period leads to the mature rRNA transcription *i.e*. transcription and repression of major and minor 5S genes respectively, as well as transcription of 45S variants 2, 3, and 4 and repression of *VAR1*.

TOR controls rRNA expression

The eukaryotic TOR (Target Of Rapamycin) pathway controls translation, growth and the cell cycle in response to environmental signals such as nutrients or growth stimulating factors (Hay and Sonenberg 2004; Menand et al. 2002; Schmelzle and Hall 2000). Studies in yeast and animal cells have shown that TOR acts positively on the activity of the eIF4F translation initiation complex and on the transcription of ribosomal protein and RNA genes therefore promoting growth in nutrient sufficient conditions (Beretta et al. 1996; Berset et al. 1998; Martin et al. 2004). In starvation conditions, TOR regulates the utilization of alternative energy resources, allows autophagy and generally drives the cell towards survival pathways (Beck and Hall 1999; Kamada et al. 2004). The antibiotic rapamycin was found to mimic starvation responses in yeast through TOR inactivation and cell cycle arrest (Barbet et al. 1996). Rapamycin leads to the formation of a ternary complex by binding simultaneously to TOR and to the FKBP12 protein (Choi et al. 1996).

However, *Arabidopsis thaliana*, and more generally land plants were found to be resistant to rapamycin due to mutations in the FKBP12 protein, suggesting TOR specificities in plants in

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

addition to conserved activities (Sormani et al. 2007). Indeed, TOR controls embryogenesis, post-embryonic development and 45S rRNA production by phosphorylation of various downstream targets in *Arabidopsis*. ChIP experiments have shown that TOR activates the expression of 45S rRNA through binding to its promoter and mainly to its 5'ETS region (Ren et al. 2011). Binding of TOR to the 5'ETS suggests a functional link between TOR and AtNUC-L1. The kinase domain of TOR is essential for 45S rDNA transcription and AtNUC-L1 might be a potential target. Although its phosphorylation by TOR has not been demonstrated, nucleolin is a phosphoprotein that can be targeted by multiple kinases (Tuteia and Tuteia 1998). Thus it is tempting to speculate that phosphorylation of AtNUC-L1 by TOR might be required for 5'ETS binding and activation of rRNA gene expression in *Arabidopsis.*

Binding of TOR to 5S rDNA has been reported in yeast and animals (Li et al. 2006; Wei et al. 2009) but not yet in *Arabidopsis*, even though the conservation of TOR suggests that TOR regulates also Pol III transcription in plants, to coordinate the transcription of the different rRNA species.

Although postulated, there is no clear evidence indicating whether the maintenance of an equimolar supply of ribosomal components reflects communication between the nuclear transcriptional machineries such as Pol I and Pol III in Arabidopsis. This interesting question deserves further investigation.

In conclusion, although 45S and 5S RNA genes are transcribed by two different RNA polymerases, Pol I and Pol III respectively, and involve different transcription factors, parallels concerning their organization, function and transcription regulation can be drawn. The following model is proposed: in the Columbia accession, 5S major genes and 45S rDNA variants 2, 3, and 4 are transcribed. Inversely, 5S minor/heterogenous genes and 45S rDNA variant 1 are repressed. In addition, depending on the tissues, the total 5S and 45S rRNA

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

quantities vary. This illustrates a level of qualitative regulation, with the selective transcription or repression of a subset of genes, and a level of quantitative regulation depending on the need of ribosomes for protein synthesis.

The qualitative regulation is achieved by a combination of symmetrical methylation maintenance and *de novo* deposition of asymmetrical methylation, mediated by the RdDM pathway. Together with specific histone modifications this leads to repression of certain 5S and 45S genes, *i.e*. the correct choice of the gene variants for transcription.

Tightly regulated amounts of the specific transcription factor TFIIIA control the quantitative regulation of 5S rRNA transcription. Similarly, phosphorylation or other post-traductional modifications of the nucleolin protein are supposed to be required for activation of 45S RNA gene expression, suggesting that the level of 45S rRNA transcription might be regulated by the amount of this modified/activated nucleolin protein.

Furthermore, TOR might emerge as a central player in the coordination of 5S and 45S rRNA expression. Indeed, TOR directly interacts with 45S rDNA *in vivo* to regulate rRNA expression and phosphorylation of AtNUC-L1 by TOR might be a way to link rRNA transcription with nutrient availability. Coordination of 5S rRNA transcription with 45S rRNA transcription might result from binding of TOR proteins to 5S RNA genes, but the nucleolin protein might also control expression of Pol III-transcribed genes. This highly coordinated regulation of 5S and 45S is very likely motivated by the requirement for stoechiometric amounts of the different ribosomal RNA families.

Ackknowledgments:

We apologize to all colleagues whose work couldn't be cited in the review due to space constraints. We thank E. Vanrobays and A. Probst for critical reading of the manuscript. E.L is supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

References

AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796-875.

Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S. and Bouvet, P. (2006) Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* 25: 1669-1679.

Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F. and Hall, M.N. (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7: 25-42.

Beck, T. and Hall, M.N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402: 689-692.

Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. and Sonenberg, N. (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15: 658-664.

Berset, C., Trachsel, H. and Altmann, M. (1998) The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4264-4269.

Blevins, T., Pontes, O., Pikaard, C.S. and Meins, F., Jr. (2009) Heterochromatic siRNAs and DDM1 independently silence aberrant 5S rDNA transcripts in Arabidopsis. *PLoS One* 4: e5932.

Bogenhagen, D.F., Sakonju, S. and Brown, D.D. (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* 19: 27-35.

Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A. and Town, C.D. (1992) Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of Arabidopsis thaliana. *Gene* 112: 225-228.

Challice, J.M. and Segall, J. (1989) Transcription of the 5 S rRNA gene of Saccharomyces cerevisiae requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J Biol Chem* 264: 20060-20067.

Chen, Z.J., Comai, L. and Pikaard, C.S. (1998) Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in Arabidopsis allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14891-14896.

Chen, Z.J. and Pikaard, C.S. (1997) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev* 11: 2124-2136.

Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L. and Clardy, J. (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273: 239-242.

Clemens, K.R., Liao, X., Wolf, V., Wright, P.E. and Gottesfeld, J.M. (1992) Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10822-10826.

Clemens, K.R., Wolf, V., McBryant, S.J., Zhang, P., Liao, X., Wright, P.E. and Gottesfeld, J.M. (1993) Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science* 260: 530-533.

Cloix, C., Tutois, S., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G. and Tourmente, S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in Arabidopsis thaliana: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res* 10: 679-690.

Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G. and Tourmente, S. (2002) Analysis of the 5S RNA pool in Arabidopsis thaliana: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res* 12: 132-144.

Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M. and Tourmente, S. (2003) In vitro analysis of the sequences required for transcription of the Arabidopsis thaliana 5S rRNA genes. *Plant J* 35: 251-261.

Copenhaver, G.P., Doelling, J.H., Gens, S. and Pikaard, C.S. (1995) Use of RFLPs larger than 100 kbp to map the position and internal organization of the nucleolus organizer region on chromosome 2 in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 7: 273-286.

Copenhaver, G.P. and Pikaard, C.S. (1996) RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of Arabidopsis thaliana adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* 9: 259-272.

Costa-Nunes, P., Pontes, O., Preuss, S.B. and Pikaard, C.S. (2010) Extra views on RNA-dependent DNA methylation and MBD6-dependent heterochromatin formation in nucleolar dominance. *Nucleus* 1: 254-259.

Doelling, J.H., Gaudino, R.J. and Pikaard, C.S. (1993) Functional analysis of Arabidopsis thaliana rRNA gene and spacer promoters in vivo and by transient expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7528-7532.

Doelling, J.H. and Pikaard, C.S. (1995) The minimal ribosomal RNA gene promoter of Arabidopsis thaliana includes a critical element at the transcription initiation site. *Plant J* 8: 683-692.

Douet, J., Blanchard, B., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2008) Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. *Plant Cell Physiol* 49: 1783-1791.

Douet, J., Tutois, S. and Tourmente, S. (2009) A Pol V-mediated silencing, independent of RNA-directed DNA methylation, applies to 5S rDNA. *PLoS Genet* 5: e1000690.

Earley, K., Lawrence, R.J., Pontes, O., Reuther, R., Enciso, A.J., Silva, M., Neves, N., Gross, M., Viegas, W. and Pikaard, C.S. (2006) Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* 20: 1283-1293.

Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2010) Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* 24: 1119-1132.

Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. and Amalric, F. (1988) A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* 175: 525-530.

Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres-Ruiz, R.A. and Jones, G. (1998) Cytogenetics for the model system Arabidopsis thaliana. *Plant J* 13: 867-876.

Fransz, P., De Jong, J.H., Lysak, M., Castiglione, M.R. and Schubert, I. (2002) Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14584-14589.

Fu, Y., Bannach, O., Chen, H., Teune, J.H., Schmitz, A., Steger, G., Xiong, L. and Barbazuk, W.B. (2009) Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA. *Genome Res* 19: 913-921.

Gaume, X., Monier, K., Argoul, F., Mongelard, F. and Bouvet, P. (2011) In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP. *Biochem Res Int* 2011: 187624.

Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G. (1984) Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* 39: 479-489.

Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K. and Schweizer, D. (1991) rDNA intergenic region from Arabidopsis thaliana. Structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *J Mol Biol* 221: 1209-1222.

Gruendler, P., Unfried, I., Pointner, R. and Schweizer, D. (1989) Nucleotide sequence of the 25S-18S ribosomal gene spacer from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 17: 6395-6396.

Haeusler, R.A. and Engelke, D.R. (2006) Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* 34: 4826-4836.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Hammond, M.C., Wachter, A. and Breaker, R.R. (2009) A plant 5S ribosomal RNA mimic regulates alternative splicing of transcription factor IIIA pre-mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 16: 541-549.
Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926-1945.
Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118-120.
Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769: 358-374.
Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H. and Kobayashi, T. (2010) Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* 327: 693-696.
Kamada, Y., Sekito, T. and Ohsumi, Y. (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 73-84.
Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet* 37: 761-765.
Kharrat, A., Derancourt, J., Doree, M., Amalric, F. and Erard, M. (1991) Synergistic effect of histone H1 and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer. *Biochemistry* 30: 10329-10336.
Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Tabata, S., Saez-Vasquez, J., Echeverria, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S. and Nakamura, K. (2007) Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of Arabidopsis thaliana and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J* 49: 1053-1063.
Korostelev, A. and Noller, H.F. (2007) The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends Biochem Sci* 32: 434-441.
Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. and Chedin, S. (2006) The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* 20: 2030-2040.
Lam, Y.W., Trinkle-Mulcahy, L. and Lamond, A.I. (2005) The nucleolus. *J Cell Sci* 118: 1335-1337.
Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W. and Pikaard, C.S. (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13: 599-609.
Li, H., Tsang, C.K., Watkins, M., Bertram, P.G. and Zheng, X.F. (2006) Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442: 1058-1061.
Martin, D.E., Soulard, A. and Hall, M.N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119: 969-979.
Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. and Tourmente, S. (2003a) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 2929-2939.
Mathieu, O., Probst, A.V. and Paszkowski, J. (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *Embo J* 24: 2783-2791.
Mathieu, O., Reinders, J., Caikovski, M., Smathajitt, C. and Paszkowski, J. (2007) Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* 130: 851-862.
Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., Vaillant, I., Sugiura, M. and Tourmente, S. (2003b) Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 31: 2424-2433.
Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B. and Matzke, A.J. (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21: 367-376.
McStay, B. (2006) Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. *Genes Dev* 20: 1207-1214.
Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. and Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6422-6427.
Mongelard, F. and Bouvet, P. (2007) Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* 17: 80-86.
Montijn, M.B., Houtsmuller, A.B., ten Hoopen, R., Oud, J.L. and Nanninga, N. (1999) The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in Petunia hybrida and Crepis capillaris. *Chromosome Res* 7: 387-399.
Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120: 613-622.
Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T. (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes Dev* 19: 2030-2040.
Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., et al. (2010) Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 6: e1001225.
Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M. and Saez-Vasquez, J. (2007) Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* 18: 369-379.
Preuss, S.B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R.J., Mosher, R., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Baulcombe, D.C., Viegas, W. and Pikaard, C.S. (2008) Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* 32: 673-684.
Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., et al. (2004) Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* 16: 1021-1034.
Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H. and Masata, M. (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96: 579-594.
Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Feng, L., Selvaraj, G. and Datla, R. (2011) Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant Physiol* 155: 1367-1382.
Rogers, S.O. and Bendich, A.J. (1987) Ribosomal RNA genes in plants: Variability in copy number and in intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
Sáez-Vásquez, J. and Echeverria, M. (2006) Polymerase I Transcription. *In:*
Grasser KD, ed. Regulation of transcription in plants. Oxford, UK: Blackwell.: pp 162–183.
Saez-Vasquez, J. and Medina, F.J. (2008) The plant nucleolus. *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology*
Elsevier Academic Press 47: 1-46.
Schmelzle, T. and Hall, M.N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262.
Shaw, P. and Doonan, J. (2005) The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle* 4: 102-105.
Shaw, P. and Jordan, E. (1995) The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 93-121.
Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C. and Robaglia, C. (2007) Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol* 7: 26.
Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A. and Barciszewski, J. (2002) 5S ribosomal DNA database. *Nucleic Acids Res* 30: 176-178.
Tucker, S., Vitins, A. and Pikaard, C.S. (2010) Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* 22: 351-356.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Tuteia, R. and Tuteia, N. (1998) a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 407-436.
Tutois, S., Cloix, C., Mathieu, O., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2002) Analysis of 5S rDNA Loci among Arabidopsis Ecotypes and Subspecies. *Genome Letters* 1: 115-122.
Unfried, I., Stocker, U. and Gruendler, P. (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from Arabidopsis thaliana Co10. *Nucleic Acids Res* 17: 7513.
Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S. and Mathieu, O. (2006) MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep* 7: 1273-1278.
Vaillant, I., Tutois, S., Cuvillier, C., Schubert, I. and Tourmente, S. (2007) Regulation of Arabidopsis thaliana 5S rRNA Genes. *Plant Cell Physiol* 48: 745-752.
Vaillant, I., Tutois, S., Jasencakova, Z., Douet, J., Schubert, I. and Tourmente, S. (2008) Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in Arabidopsis. *Plant J* 54: 299-309.
Wassenegger, M. (2000) RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43: 203-220.
Wassenegger, M. (2005) The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 122: 13-16.
Wei, Y., Tsang, C.K. and Zheng, X.F. (2009) Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *Embo J* 28: 2220-2230.
Wicke, S., Costa, A., Munoz, J. and Quandt, D. (2011) Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol Phylogenet Evol* 61: 321-332.
Yoine, M., Ohto, M.A., Onai, K., Mita, S. and Nakamura, K. (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J* 47: 49-62.
Zhang, X., Henderson, I.R., Lu, C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E. (2007) Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4536-4541.

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

Legends:

Figure 1: Localisation and function of rRNA genes in *Arabidopsis thaliana*.

A. The plant 80S ribosome is a large ribonucleoprotein complex. It consists of one molecule of each rRNA and around 80 ribosomal proteins. The small 40S subunit contains the 18S rRNA together with 33 proteins. The large 60S subunit consists of 50 proteins and 25S, 5,8S and 5S rRNA. Transcription by RNA polymerase III gives rise to a 120 nt 5S rRNA. Transcription by RNA polymerase I gives rise to a 45S rRNA, which is then processed into the 1806 nt 18S rRNA, 163 nt 5.8S rRNA, and 3384 nt 25S rRNA mature forms.

B. Localization of 5S and 45S rDNA arrays, in *Arabidopsis thaliana* Columbia accession.
The 5S arrays are in red and the NOR (nucleolus organizer region) containing the 45S arrays in green. NOR 2 and 4 are similar in size, each spanning 3,5-4,0 Mbp. The grey boxes symbolize the centromeric 180 bp repeats. Transcriptionally active 5S arrays on chromosome 4 and left arm of chromosome 5 are surrounded in blue. These two 5S blocks are around 150-250 kb-long, each containing about 300-400 tandemly repeated 5S rDNA units.
5S arrays on chromosome 3 and right arm of chromosome 5 are not transcribed. The presence of numerous mutations in the internal promoter of these genes probably prevents their transcription (Cloix et al. 2003). 5S genes from chromosome 3 are dispensable since some accessions lack these loci (Cloix et al. 2000; Fransz et al. 1998; Tutois et al. 2002).
Chromosomes and rDNA loci are drawn approximately to scale.

Figure 2: Schematic representation of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4.

Chromosome 4 contains clustered tandemly repeated 5S (red) and 45S (green) ribosomal RNA genes at centromere (grey) and Nucleolar Organizer Region (NOR) respectively.

Top: Enlarged 5S rDNA unit showing the 5' and 3' flanking sequences containing TATA-like sequence, GC sequence, C residue at -1, necessary for transcription, and a simple cluster of T residues downstream the transcribed region, used as Pol III terminator signal and specific for each 5S locus (Cloix et al. 2000; Cloix et al. 2002; Cloix et al. 2003) and 5S transcribed region containing the promoter region (Box A, Intermediate element (IE) and Box C). 5S rDNA is transcribed by Pol III and requires Transcription Factor IIIA activity (TFIIIA). Disruption of Histone Deacetylase 6 (HDA6) gene induces expression of silent minor 5S genes.

Down: Enlarged 45S rDNA unit showing Intergenic Spacer (IGS) Region containing Sal I repeats, Spacer (SP1 and SP2) and Gene (GP) Promoter sequences. The transcribed region contains External (5'ETS and 3'ETS) and Internal (ITS1 and ITS2) Transcribed Spacer and structural rRNA (18S, 5.8S and 25S) sequences. 45S rDNA is transcribed by Pol I from GP, and requires Nucleolin-Like1 (AtNUC-L1). Disruption of Histone Deacetylase 6 (HDA6) gene induces expression of silent 45S rDNA *VAR1*.

The 5S (in *chr3*, *4* and *5*) and the 45S (in *chr2* and *chr4*) arrays can be visualized by FISH (red and green signals respectively). Heterochromatic chromocenters are observed as DAPI stained structures (arrowhead). 45S loops are too thin to be visualized in the nucleolus (N). A 5S loop extending from a chromocenter is shown (arrow).

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

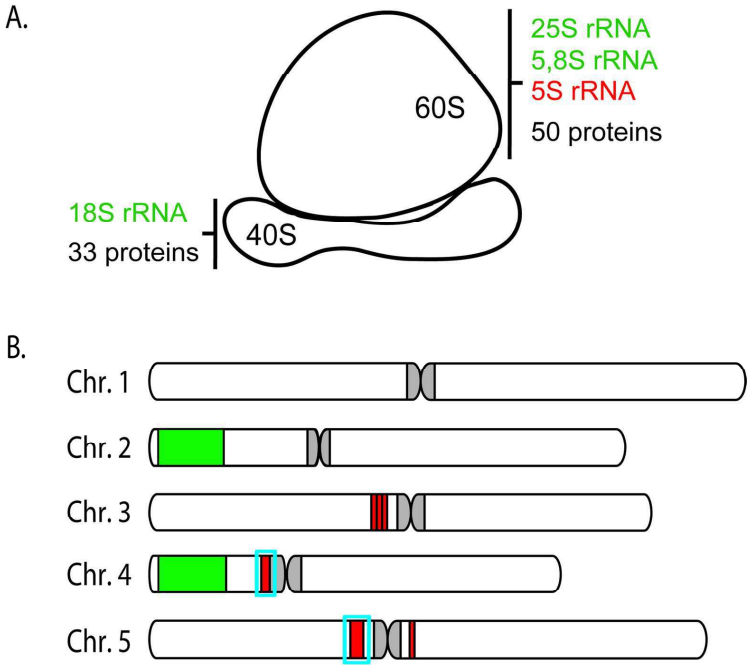


Figure 1: Localisation and function of rRNA genes in Arabidopsis thaliana.

A. The plant 80S ribosome is a large ribonucleoprotein complex. It consists of one molecule of each rRNA and around 80 ribosomal proteins. The small 40S subunit contains the 18S rRNA together with 33 proteins. The large 60S subunit consists of 50 proteins and 25S, 5,8S and 5S rRNA. Transcription by RNA polymerase III gives rise to a 120 nt 5S rRNA. Transcription by RNA polymerase I gives rise to a 45S rRNA, which is then processed into the 1806 nt 18S rRNA, 163 nt 5.8S rRNA, and 3384 nt 25S rRNA mature forms.

B. Localization of 5S and 45S rDNA arrays, in Arabidopsis thaliana Columbia accession.
The 5S arrays are in red and the NOR (nucleolus organizer region) containing the 45S arrays in green. NOR 2 and 4 are similar in size, each spanning 3,5-4,0 Mbp. The grey boxes symbolize the centromeric 180 bp repeats. Transcriptionally active 5S arrays on chromosome 4 and left arm of chromosome 5 are surrounded in blue. These two 5S blocks are around 150-250 kb-long, each containing about 300-400 tandemly repeated 5S rDNA units.
5S arrays on chromosome 3 and right arm of chromosome 5 are not transcribed. The presence of numerous mutations in the internal promoter of these genes probably prevents their transcription (Cloix et al. 2003). 5S genes from chromosome 3 are dispensable since some accessions lack these loci (Cloix et al. 2000; Fransz et al. 1998; Tutois et al. 2002).
Chromosomes and rDNA loci are drawn approximately to scale.

78x69mm (600 x 600 DPI)

Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012

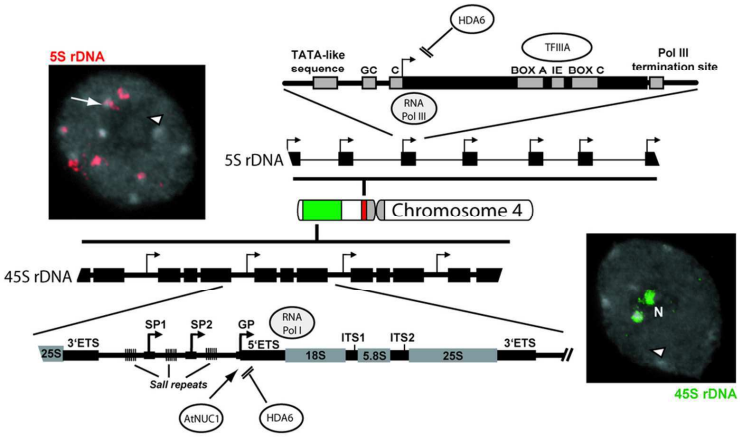
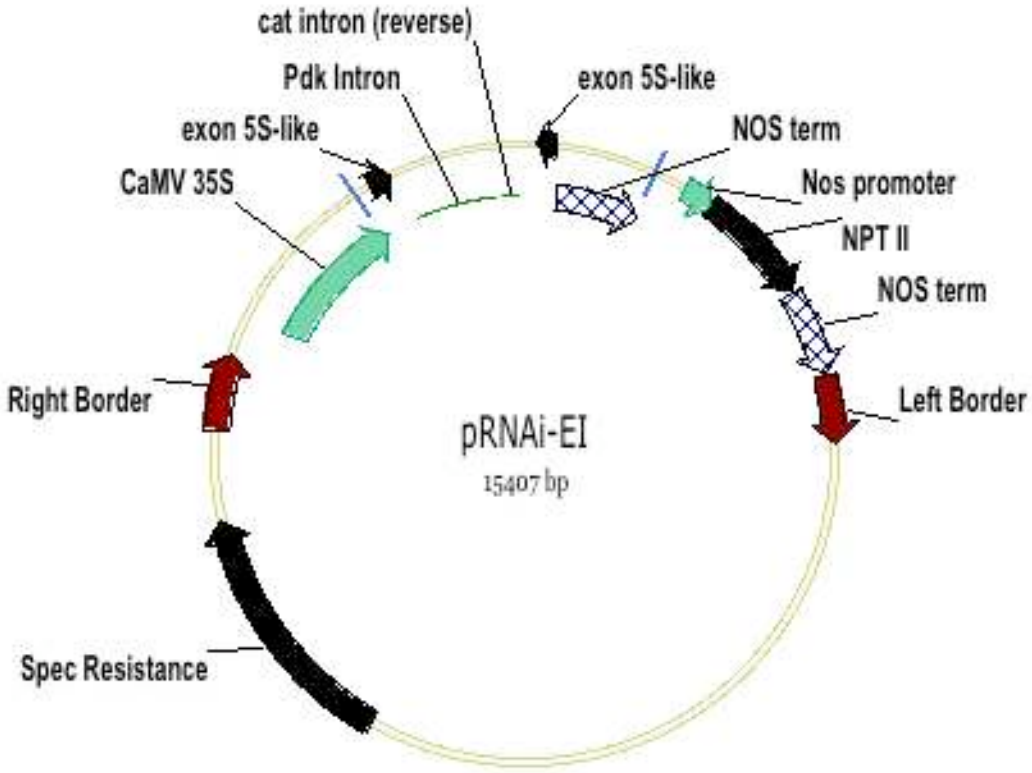


Figure 2: Schematic representation of Arabidopsis thaliana chromosome 4.

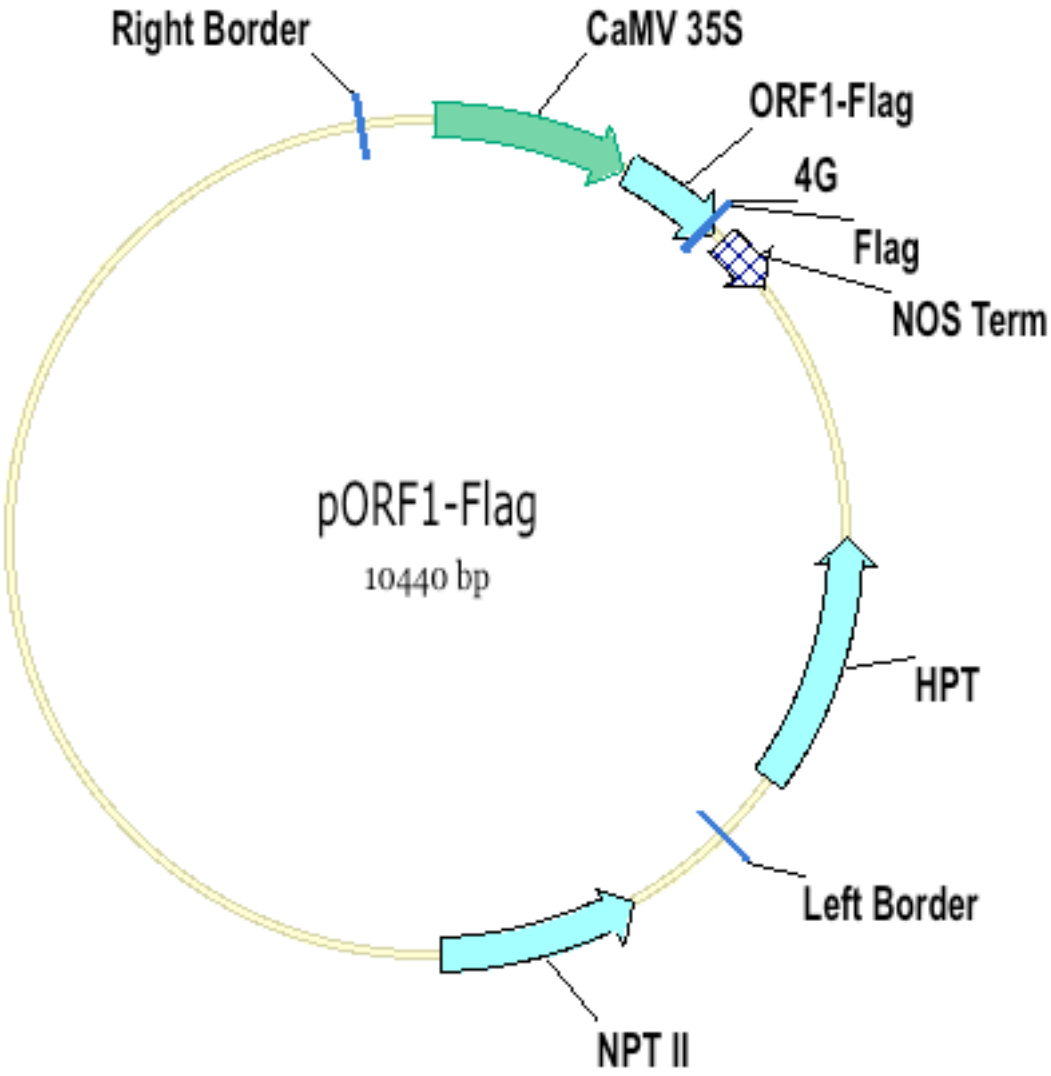
Chromosome 4 contains clustered tandemly repeated 5S (red) and 45S (green) ribosomal RNA genes at centromere (grey) and Nucleolar Organizer Region (NOR) respectively.
Top: Enlarged 5S rDNA unit showing the 5' and 3' flanking sequences containing TATA-like sequence, GC sequence, C residue at -1, necessary for transcription, and a simple cluster of T residues downstream the transcribed region, used as Pol III terminator signal and specific for each 5S locus (Cloix et al. 2000; Cloix et al. 2002; Cloix et al. 2003) and 5S transcribed region containing the promoter region (Box A, Intermediate element (IE) and Box C). 5S rDNA is transcribed by Pol III and requires Transcription Factor IIIA activity (TFIIIA). Disruption of Histone Deacetylase 6 (HDA6) gene induces expression of silent minor 5S genes.
Down: Enlarged 45S rDNA unit showing Intergenic Spacer (IGS) Region containing Sal I repeats, Spacer (SP1 and SP2) and Gene (GP) Promoter sequences. The transcribed region contains External (5'ETS and 3'ETS) and Internal (ITS1 and ITS2) Transcribed Spacer and structural rRNA (18S, 5.8S and 25S) sequences. 45S rDNA is transcribed by Pol I from GP, and requires Nucleolin-Like1 (AtNUC-L1). Disruption of Histone Deacetylase 6 (HDA6) gene induces expression of silent 45S rDNA VAR1.
The 5S (in chr3, 4 and 5) and the 45S (in chr2 and chr4) arrays can be visualized by FISH (red and green signals respectively). Heterochromatic chromocenters are observed as DAPI stained structures (arrowhead). 45S loops are too thin to be visualized in the nucleolus (N). A 5S loop extending from a chromocenter is shown (arrow).

90x53mm (300 x 300 DPI)

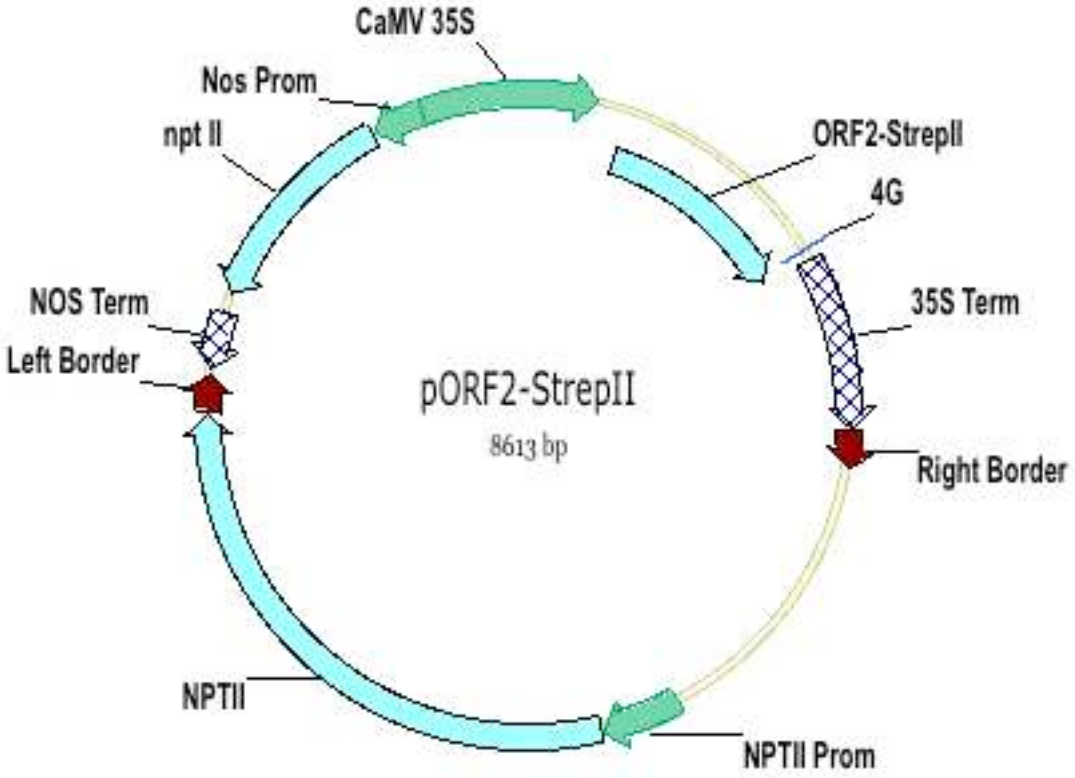
Downloaded from http://pcp.oxfordjournals.org/ at INIST-CNRS on January 12, 2012



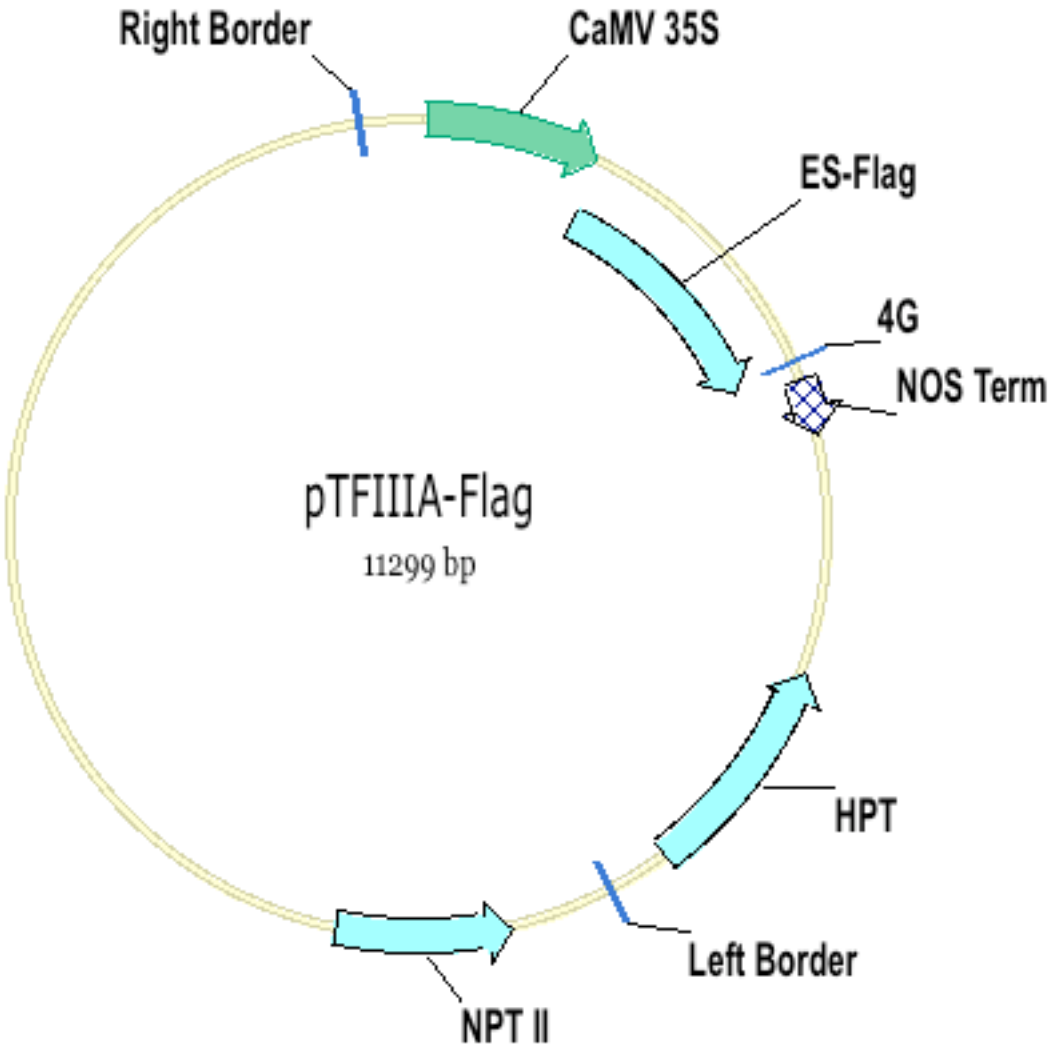
Représentation schématique du vecteur pRNAi-EI.
La séquence de l'exon « 5S-like » a été clonée, en orientation sens et antisens, dans le vecteur pHellsgate 12 sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S (CSIRO, Australia). Après épissage des introns PdK et cat, une structure en épingle à cheveux de la séquence de l'exon « 5S-like » est obtenue. La résistance spectinomycine (Spec) a été utilisée pour la sélection en bactérie et la résistance kanamycine (NPTII), pour la sélection en plante. Le terminateur Nos (NOS term) permet l'arrêt de la transcription des transgènes. Les régions « right border » et « left border » délimitent la portion du vecteur qui sera intégrée dans le génome de la plante.



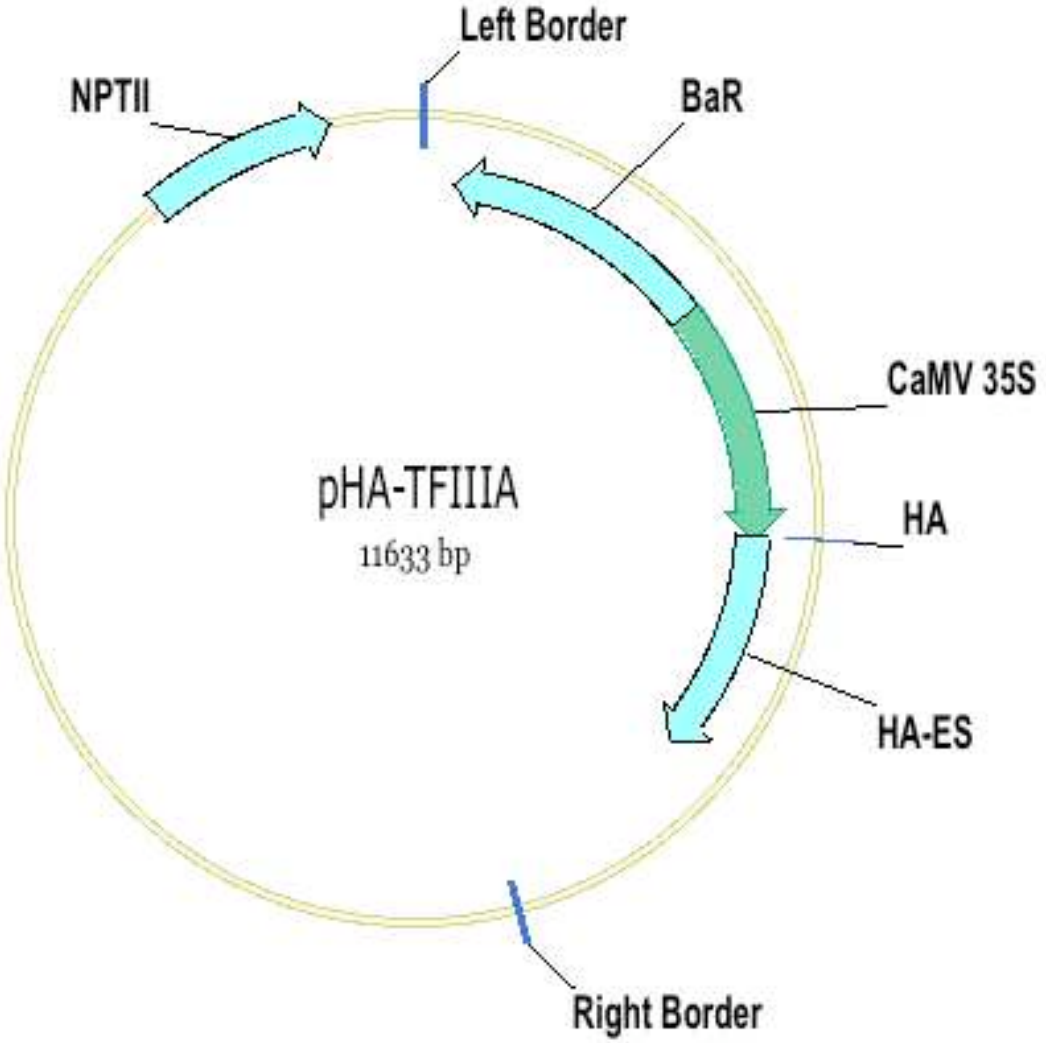
Représentation schématique du vecteur pORF1-Flag.
La séquence de l'ORF 1 du transcrit EI a été clonée dans le vecteur PCW553 (dérivant d'un pCAMBIA 1300) sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S. Une séquence codant pour 4 glycines (G) a été ajoutée en 3' de l'ORF 1 afin que l'étiquette Flag ne perturbe pas la conformation de la protéine après traduction. La résistance kanamycine (NPTII) a été utilisée pour la sélection en bactérie et la résistance hygromycine (HPT), pour la sélection en plante. Le terminateur Nos (NOS Term) permet l'arrêt de la transcription des transgènes. Les régions « right border » et « left border » délimitent la portion du vecteur qui sera intégrée dans le génome de la plante.



Représentation schématique du vecteur pORF2-StrepII.
La séquence de l'ORF 2 du transcrit EI a été clonée dans le vecteur pMRT1756 (dérivant d'un pCAMBIA 1300) sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S. Une séquence codant pour 4 glycines (G) a été ajoutée en 3' de l'ORF 2 afin que l'étiquette StrepII ne perturbe pas la conformation de la protéine après traduction. La résistance kanamycine (NPTII) a été utilisée pour la sélection en bactérie et en plante. Les terminateurs 35S (35S Term) et Nos (Nos Term) permettent l'arrêt de la transcription des transgènes. Les régions « right border » et « left border » délimitent la portion du vecteur qui sera intégrée dans le génome de la plante.



Représentation schématique du vecteur pTFIIIA-Flag.
La séquence du transcrit ES a été clonée dans le vecteur PCW553 (dérivant d'un pCAMBIA 1300) sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S. Une séquence codant pour 4 glycines (G) a été ajoutée en 3' de l'ADNc ES afin que l'étiquette Flag ne perturbe pas la conformation de la protéine après traduction. La résistance kanamycine (NPTII) a été utilisée pour la sélection en bactérie et la résistance hygromycine (HPT), pour la sélection en plante. Le terminateur Nos (NOS Term) permet l'arrêt de la transcription des transgènes. Les régions « right border » et « left border » délimitent la portion du vecteur qui sera intégrée dans le génome de la plante.



Représentation schématique du vecteur pHA-TFIIIA.
La séquence du transcrit ES a été clonée dans le pEarleygate 201 sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S. Une séquence codant une étiquette HA est située en 3' de l'ADNc ES. La résistance kanamycine (NPTII) a été utilisée pour la sélection en bactérie et la résistance BASTA ou glufosinate ammonium (BaR), pour la sélection en plante. Les régions « right border » et « left border » délimitent la portion du vecteur qui sera intégrée dans le génome de la plante.

Extractions ARN et Northern Blot : composition des tampons

Tampon d'extraction Guanidine

Hydrochloride de Guanidine	8 M
MES (N-morpholino ethane sulfonic acid)	20 mM
EDTA	20 mM

Ajuster le pH à 7.0 avec HCl

Ajouter du β-Mercaptoéthanol à 50mM final avant utilisation.

Tampon d'extraction *(VICIENT and DELSENY 1999)*

LiCl	8M
β-Mercaptoéthanol	2 %

Tampon de solubilisation *(VICIENT and DELSENY 1999)*

SDS	0,5%
NaCl	100 mM
EDTA	25 mM
Tris-HCl, pH 7,6	10 mM
β-Mercaptoéthanol	2%

Tampon de charge ARN

Formamide	50%
Formaldéhyde 37%	6%
Tampon MOPS 10X	1X

Glycérol	10%
Bleu de bromophénol	0,25%
Bromure d'éthidium	20 µg/ml

Gel MOPS-Agarose

Agarose	1%
MOPS10X	1X
H_2O	qsp 300 mL

Faire fondre le gel, laisser refroidir au bain marie à 55°C, ajouter :

Formaldéhyde	1,9%

Tampon d'hybridation ARN, Tampon Church

Bovine serum albumine	1%
EDTA	1 mM
Tampon phosphate	0,5 M
SDS	7%

Tampon phosphate 0,5M pH7,2

Na_2HPO_4 $2H_2O$	1M
85% H_3PO_4	1M

Tampon MOPS 10X

MOPS	200 mM
Acétate de Sodium	50 mM

EDTA	10 mM

Ajuster le pH à 7.0 avec NaOH

Filtrer sur membrane 0.22 µm

Tampon SSC 20X

NaCl	3M
Citrate de Sodium	0,3M
H_2O	qsp 1 L

Ajuster le pH à 7,2 avec HCl

Stériliser à l'autoclave.

Extractions protéiques et Western Blot : Composition des tampons

Tampon d'extraction

Tris-HC, pH 7,5	100 mM
Glycérol	20 %
EDTA	2 mM
DTT	1 mM
NP40	0,2%
Protease inhibitor (Sigma)	1X

Tampon de migration

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0,1%

Tampon de transfert

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Ethanol	20%

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2.7mM
Na_2HPO4	8 mM
KH_2PO4	1.46 mM puis ajuster le pH à 7,4 avec NaOH et stériliser à l'autoclave

Milieux pour transformation de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

2YT

Tryptone	16 g
Yeast Extract	10g
NaCl	5 g
H_20	qsp 1 litre

Ajuster le pH à 7 avec NaOH

Autoclaver

Milieu d'infiltration

Sucrose	5g
$MgCl_2$ 1M	10 ml
H_2O	qsp 100 mL

Juste avant d'infiltrer les plantes, ajouter :

Silwet	40 µl