HAL
open science

ADN ribosomique 5S chez Arabidopsis thaliana : dynamique chromatinienne et ARN polymérase IV

Julien Douet

To cite this version:

Julien Douet. ADN ribosomique 5S chez Arabidopsis thaliana : dynamique chromatinienne et ARN polymérase IV. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2008. Français. NNT : . tel-00731526

HAL Id: tel-00731526

https://theses.hal.science/tel-00731526

Submitted on 13 Sep 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. 1902 **Année 2008**

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Spécialité: Génétique Moléculaire)

Soutenue le
15 Décembre 2008

JULIEN DOUET

ADN RIBOSOMIQUE 5S CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*: DYNAMIQUE CHROMATINIENNE ET ARN POLYMÉRASE IV

Président: **Pr. Georges PICARD**, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd
Membres: **Dr. Philippe ARNAUD**, IGMM, Montpellier
Dr. Sylvette TOURMENTE, Université Blaise Pascal, Directrice de thèse
Rapporteurs: **Dr. Valérie GAUDIN**, INRA, Versailles
Dr. Thierry LAGRANGE, Université de Perpignan

UMR/CNRS 6247, Clermont Université, INSERM U931
24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex

Merci à Philippe Arnaud, Valérie Gaudin et Thierry Lagrange d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci d'avoir bravé les éléments pour être présents à cette journée très particulière : la première fois que j'ai détesté la neige.

Merci à Georges Picard de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir présidé mon jury de thèse : ça ne pouvait être que vous.

Merci à Sylvette Tourmente alias La Chef alias Le Mécène des Petits Créateurs des Halles. Merci de m'avoir encadré durant ces années, merci pour tous ces « aloOoOOors !? », pour les « WaAaaAA cette tête !!! » TOUS les matins, merci également pour ta disponibilité notamment pour les diverses relectures de manuscrits, etc, etc… Je sais que, pour toi, ce futur sans moi sera difficile (à moins que tu m'aies déjà remplacé). Je sais qu'Illustrator, Photoshop, les ordinateurs en général, ta calculatrice vont te malmener. Sois forte.

Un grand merci plus une poignée de bisous à mes deux autres encadrantes… même si c'est pas de l'encadrement pareil que celui de La Chef, ça compte aussi. Merci donc à ma maman de laboratoire (c'est Claudine !). Merci pour les pancakes, les confitures, les clafoutis, les bavardages, le soutien que tu m'as témoigné qui fut digne d'une vraie maman. Merci à Esméralda Princesse Manouche (ça c'est Sylvie). Tu as su être à l'écoute, me conseiller, me rassurer, me soutenir. Tu mérites toi aussi le titre de maman de laboratoire…bon c'est déjà pris alors tu seras tata de laboratoire.

Pour le reste des remerciements, j'ai fait une liste parce que c'est moins compliqué d'un point de vue politico-social. Vous pouvez apparaître sur cette liste pour une ou plusieurs raisons :

1/ Parce que, depuis le début, vous avez tout fait pour moi, vous m'avez poussé encore et toujours, vous aviez du mal à respirer quand j'étais en bas de l'amphi et vous avez laissé l'empreinte de vos ongles dans la tablette devant vous.
2/ Parce qu'on a partagé des chouettes trucs et c'était chouette… ça va au-delà d'un bureau, d'un café, d'un loyer, d'une entrecôte, d'une conversation dans un couloir ou je ne sais pas quoi d'autre.
3/ Parce que grâce et avec vous j'ai pu penser à autre chose, que ce soit au labo ou à l'extérieur : j'ai pu rigoler, écouter, danser, parler, me détendre, pratiquer le errennerre, piailler, ronchonner, ne rien faire, me balader, jouer et découvrir de nouvelles choses.
4/ Parce qu'à 4h du mat' quand j'étais en train de rédiger vous étiez là et que sans vous j'aurais craqué.
5/ Parce que je sais que je peux compter sur vous.

Ableton Live, Aurélie C, Battles, Bertrand B, Bertrand F, Boards of Canada, Caroline V, Cédric B, Charles W, Chris Clark, Classical, Cross the Track, Cyril C, Danton Eeprom, Dinosaure, Elodie L, FIBenicassim, Gaëlle R, Gilbert D, Illustrator, Jackson et son orchestre d'ordinateurs, Jean-Baptiste V, Jeanne LC, Jean-Yves B, Julie B, Julien B, Kassandrou n°46, K-ly, Krups, La Coopé, Laure C-GdS, LCD Soundsystem, Le Massif du Sancy, L'ensemble de Biomove passé et présent parce que c'était bien, Les Nuits Sonores, LFO, Ludo L, Lulu L, Marcassin, Marie-Claude C, Maru G, Maryse B, Matthew Dear, Mélanie S, Metronomy, Mon proprio pervers sans qui je n'aurais pas habité au 29 rue Montlosier, Nathan Fake, Nick Drake, Nicole D, Pierre-Yves C, Punkie B, QdiLuc M, Sam L, Sébichoux L, Simon A, Simon T, Sophie D, Sophie F, Soulseek, Swayzak, Sylvain M, Sylviane C, The Foals, Thu B, Xavier B …Yo !

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S sont regroupés en blocs situés dans l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 3, 4 et 5. La transcription des gènes d'ARNr 5S est régulée par des facteurs épigénétiques altérant notamment leur structure chromatinienne. Une étude a été menée durant les premières étapes du développement post-germinatif pour identifier les évènements et des facteurs conduisant à l'élaboration de telles structures. Nous avons pu observer une décompaction de l'ADNr 5S immédiatement suivie d'une recondensation. Ces phénomènes impliquent respectivement ROS1 et l'ARN polymérase IV. L'étude des formes Pol IVa et Pol IVb nous indique que Pol IVb, en plus de son activité partenaire de Pol IVa, possède une action spécifique dédiée au locus d'ADNr 5S du chromosome 4. Cette nouvelle activité de Pol IVb, qui est indispensable au silencing et à la compaction de ce locus, semble indépendante de la voie classique de méthylation de l'ADN dépendante des ARN.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, 5S rRNA genes are found clustered at pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5. 5S rRNA genes transcription is epigenetically regulated through the formation of specific chromatin structure. In order to determine the events that lead to the establishment of such structures, a study during the first steps of post-germinative plant development was done. Unexpectedly, we observed a decondensation followed by a rapid "re"condensation of 5S rDNA chromatin. These two phenomenons are respectively dependent on ROS1 and RNA polymerase IV activities. A more precise analyse on the two Pol IV isoforms, i.e. Pol IVa and Pol IVb, revealed a new function for Pol IVb. Indeed, in addition to its activity in a partnership with Pol IVa, Pol IVb has a specific role in the silencing and the compaction of the 5S rDNA locus from the chromosome 4. This activity seems to be independent of the Pol IVa activity and the RNA dependent DNA methylation pathway.

SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS **3**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **4**

CHAPITRE 1 :L'ADN RIBOSOMIQUE 5S **7**

1.Le Ribosome 8
2.L'ARNr 5S : fonctions, structure et interactions 8
3.Les gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis thaliana 10
3.1.Structure 10
3.1.1.Le promoteur interne 10
3.1.2.Région intergénique en amont du site d'initiation de transcription 11
3.1.3.Région intergénique en aval de la région transcrite 12
3.2.Le complexe de transcription des gènes d'ARNr 5S 12
3.2.1.Le facteur de transcription TFIIIA 13
3.2.2.Le facteur de transcription TFIIIC 13
3.2.3.Le facteur de transcription TFIIIB 14
3.3.Organisation des gènes d'ARNr 5S 14
3.4.Organisation et localisation des gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis thaliana 15
3.5.Les gènes d'ARNr 5S sont hétérogènes 15
3.5.1.Hétérogénéité inter-loci chez Arabidopsis thaliana 16
3.5.2.Hétérogénéité intra-locus chez Arabidopsis thaliana 17
3.6.Méthylation des gènes d'ARNr 5S et transcription 18
3.7.Répression des gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis thaliana 19

CHAPITRE 2 :LES MODIFICATIONS DE L'ADN ET DES HISTONES **22**

1.La méthylation de l'ADN 23
1.1.Les ADN méthyltransférases 23
1.1.1.MET1 (METHYLTRANSFERASE1) 24
1.1.2.CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) 24
1.1.3.DRM (« Domains Rearranged Methyltransferases ») 25
1.1.4.DDM1 (« Decrease in DNA Methylation 1 ») 26
2.Modifications post-traductionnelles des histones 27
2.1.L'acétylation des histones 27
2.2.Méthylation des histones 28

CHAPITRE 3:REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR LES ARN **30**

1.Le phénomène de RdDM ou la méthylation ADN dirigée par les ARN 31
1.1.Les composants de la RdDM chez Arabidopsis thaliana 32
1.2.Les petits ARN hétérochromatiques chez les plantes 34
1.3.La déméthylation de l'ADN 35
1.3.1.DEMETER et DEMETER-LIKE 36
1.3.2.REPRESSOR OF SILENCING 1 36
2.L'ARN POLYMERASE IV 38
2.1.Identification de l'ARN polymérase IV 38
2.2.L'ARN polymérase IV et le « silencing » transcriptionnel via les siRNA. 39
2.3.La forme ARN polymérase IVa 41
2.3.1.NRPD1a : caractérisation et modes d'action proposés 41
2.3.2.RDR2 et CLSY : partenaires privilégiés de Pol IVa 42
2.4.La forme ARN polymérase IVb 43
2.4.1.NRPD1b : caractérisation et mode d'action proposé 43
2.4.2.Les partenaires de NRPD1b : AGO4, DRM2 et DRD1 45
2.4.2.1.DRD1 45
2.4.2.2.ARGONAUTE (AGO4 et AGO6) 46
2.4.2.3.DRM 47
2.4.2.4.DMS3 48
2.5.Localisation nucléaire des protéines intervenant dans la voie Pol IV 49

2.6.Deux exemples d'actions probables pour l'ARN polymérase IV....50
2.7.Implications physiologiques de l'activité ARN polymérase IV....51
2.7.1.L'ARN Pol IV et la floraison....52
2.7.2.L'ARN Pol IV et la réponse au stress: les voies nat-siRNA et l-siRNA....52
2.7.3.Pol IV et propagation du « silencing »....53

CHAPITRE 4 :DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE 54

1.Réorganisation de la chromatine liée à des facteurs environnementaux (le complexe eNoSC)...55
2.Réorganisation de la chromatine et développement....56
2.1.Durant la phase embryonnaire précoce 56
2.2.Durant le phénomène de dédifférenciation cellulaire 57
3.Réorganisation de la chromatine et transcription 58

OJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE....60

RESULTATS....62

ARTICLE N°1 :« Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in Arabidopsis thaliana ans Xenopus laevis »....63

ARTICLE N°2 :« Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling»....74

ARTICLE N°3 :« Pol IVb has a preponderant role on 5S rDNA array from chromosome 4 in Arabidopsis» 86

DISCUSSION et PERSPECTIVES 107

1.Le remodelage de la chromatine dans les étapes précoces du développement....108
1.1.L'ADNr 5S au 2ème après germination en conditions sauvage et nrpd2a....108
1.2.La décompaction de l'ADNr 5S 109
1.3.La condensation de l'ADNr 5S 110
1.4.Les effets des actions combinées de ROS1 et de l'ARN polymérase IV....110
1.5.Les foci hétérochromatiques surnuméraires 111
2.Pol IVa et Pol IVb dans la régulation de l'ADNr 5S....112
2.1.Coopération de Pol IVa et Pol IVb dans la répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S....112
2.2.Un nouveau rôle pour Pol IVb sur le locus d'ADNr 5S du chromosome 4....113
2.3.Le transcrit 5S-210 et RDR2 114
2.4.Modèle d'action de la voie ARN polymérase IV dépendante des siRNA sur l'ADNr 5S....115
3.Perspectives....115

REFERENCES 118

ANNEXES....137

ARTICLE N°4 :« Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in Arabidopsis »....139

ARTICLE N°5 :« Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of Nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis»....151

LISTES DES ILLUSTRATIONS

FIGURES **PAGE**

1: Compostion des ribosomes procaryotes et eukaryotes 8
2: Structure secondaire de l'ARNr 5S chez l'Homme 9
3: Interactions de l'ARNr 5S avec les protéines TFIIIA et L5 dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* 10
4: Organisation des trois types de promoteur utilisés par l'ARN polymérase III 11
5: Structure des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* 12
6: Assemblage du complexe de transcription sur un gène d'ARNr 5S 14
7: Localisation des blocs d'ADNr 5S, d'ADNr 45S et des répétitions centromériques chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia 15
8: Le "T-stretch" des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia 16
9: Localisation des YAC 6A1 et 4E4 sur le bloc d'ADNr 5S du bras gauche du chromosome 5 17
10: Modèle des boucles d'ADNr 5S 21
11: Mécanisme général de la méthylation de l'ADN dépendante des ARN (RdDM) 32
12: Modèle de déméthylation de l'ADN par ROS1 35
13: Deux modèles impliquant l'ARN polymérase IVa sur des matrices ARNdb 42
14: Les constructions "target" et "silencer" utilisées par le groupe de M. Matzke 45
15: Localisation de partenaires de la voie ARN polymérase IV dans le nucléole et à deux cibles génomiques: l'ADNr 5S et l'ADNr 45S 49
16: Un modèle d'action de l'ARN polymérase IV 50
17: Modèle d'action de l'ARN polymérase IV sur les séquences solo LTR 51
18: Réorganisation de la chromatine durant les phases précoces de 57l'embryogenèse chez la souris 57
19: Condensation des loci 1Ax1 transgéniques au 6ème et 13ème jours après floraison chez le maïs 58
20: Modèle d'action des ARN Pol IVa et Pol IVb sur l'ADNr 5S 114

TABLEAU

1: La méthylation des histones chez *Arabidopsis thaliana* 29

Synthèse Bibliographique

La chromatine des noyaux eucaryotes se présente sous deux formes distinctes. D'un côté, l'euchromatine, peu condensée, contient la grande majorité des gènes. De l'autre, longtemps considérée comme transcriptionnellement inactive, l'hétérochromatine est composée principalement de séquences répétées, incluant notamment les régions centromériques et péricentromériques ainsi que les centres organisateurs nucléolaires. D'un point de vue cytologique, l'hétérochromatine se distingue du reste de la chromatine par une forte condensation observable tout au long de l'interphase. Les premiers travaux menés sur cette structure particulière ont pu mettre en évidence une forte méthylation de son ADN associée à des marques histones répressives. Plus récemment, les recherches se sont tournées vers la mise en place de l'hétérochromatine et plus particulièrement sur l'instauration de la méthylation ADN *de novo* des séquences hétérochromatiques. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que le phénomène d'hétérochromatinisation repose en partie sur des mécanismes réversibles conférant ainsi une grande malléabilité à une fraction de l'hétérochromatine.

Les gènes d'ARN ribosomique 5S (ARNr 5S), du fait de leur localisation péricentromérique, en d'autres termes à la frontière entre euchromatine et hétérochromatine, constituent un modèle de choix pour l'étude de la mise en place et de la plasticité de l'hétérochromatine. Précédemment, des travaux réalisés dans notre équipe avaient démontré l'existence de remodelage de la chromatine permettant l'installation d'une conformation mature des loci d'ADN ribosomique 5S (ADNr 5S) dès le début du développement de la plante *Arabidopsis thaliana*.

L'objectif de mes travaux de thèse était d'approfondir les mécanismes intervenant durant cette courte fenêtre et de comprendre comment la cellule, à partir d'une structure de l'ADNr 5S très compacte à la germination installe un contexte chromatinien permissif à la transcription des gènes d'ARNr 5S. Il était notamment essentiel de comprendre le rôle de l'ARN polymérase IV dans ces remaniements de la chromatine puisque des travaux d'autres groupes avaient démontré son implication dans la méthylation ADN *de novo* et la compaction de l'ADNr 5S. En guise d'introduction aux résultats obtenus, la synthèse bibliographique s'articulera autour de quatre chapitres. Le premier chapitre présentera le modèle ADNr 5S, le deuxième décrit les mécanismes intervenant dans la méthylation de l'ADN et certaines modifications post-traductionnelles impliquées dans le contrôle de

l'expression génique et de la structure chromatinienne. Le troisième chapitre sera dédié à la mise en place de la méthylation ADN dépendante des ARN. Une part importante de ce chapitre sera consacrée à l'ARN polymérase IV. Enfin, le quatrième chapitre présentera quelques exemples de dynamique de la chromatine en réponse à des contraintes physiologiques et développementales.

Chapitre 1 :

L’ADN ribosomique 5S

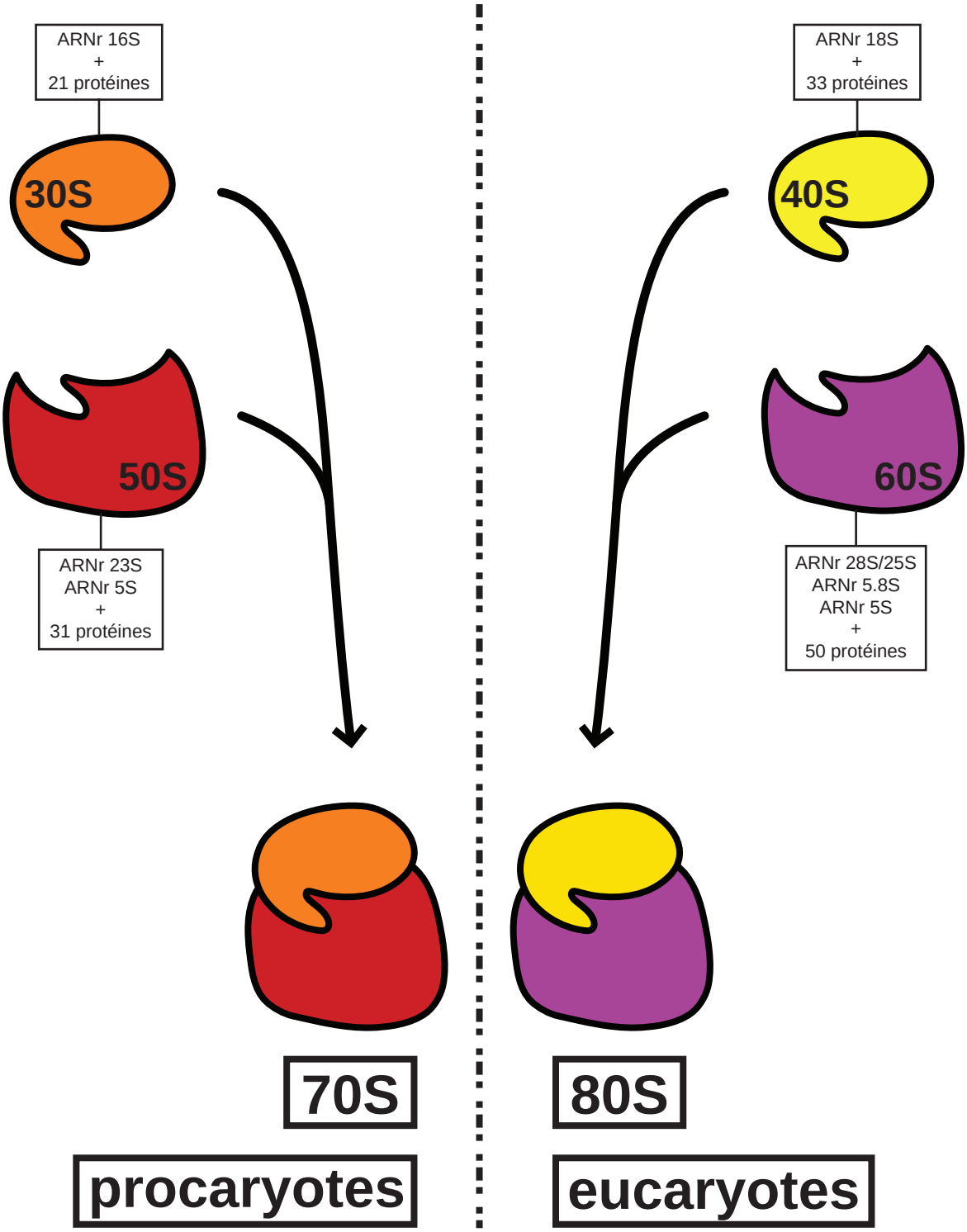


Figure 1: Compostion des ribosomes procaryotes et eucaryotes. (Chez les plantes l'ARNr 28S est remplacé par l'ARNr 25S).

1.Le Ribosome

Au centre du processus de synthèse protéique se trouvent les ribosomes. Ces derniers coordonnent l'action de l'ARN messager (ARNm) à traduire, de divers facteurs protéiques et des ARN de transfert (ARNt) portant les acides aminés à assembler pour former la chaîne polypeptidique. De par sa fonction essentielle, le ribosome est retrouvé dans la cellule, tout au long de l'évolution, du procaryote jusqu'aux eucaryotes supérieurs. Il est invariablement composé d'une grande et d'une petite sous-unité assemblées lors de l'initiation de la traduction. Alors que la petite sous-unité a un rôle dans le décodage de l'information portée par l'ARNm, la grande sous-unité est impliquée dans les activités catalytiques. Malgré la forte conservation de la fonction ribosomale, la composition en ARN et protéines, au sein même des sous-unités, varie entre procaryotes et eucaryotes. En effet, chez les organismes eucaryotes, les sous-unités 40S et 60S forment l'unité ribosomale 80S, intégrant au total 4 ARN ribosomiques (ARNr) différents et environ 80 protéines. Chez les procaryotes, le ribosome est plus petit (70S). Il provient de l'association des sous-unités 30S et 50S et comprend 3 ARNr distincts ainsi qu'une cinquantaine de protéines (Figure1).

Dans la cellule eucaryote les ARNr 28S (25S chez la plante), 18S et 5.8S proviennent de la transcription par l'ARN polymerase I. L'ARNr 5S quant à lui est produit par l'ARN polymerase III. Une fois produits, ARNr et protéines ribosomales (codées par des gènes transcrits par l'ARN polymérase II) sont associés en particules pré-ribosomales dans le nucléole. Après un passage par le nucléoplasme, ces particules sortent du noyau pour être assemblées en ribosomes matures dans le cytoplasme.

2.L'ARNr 5S : fonctions, structure et interactions

La plus petite composante ARN retrouvée dans les grandes sous-unités ribosomales est l'ARNr 5S. Depuis de nombreuses années, l'ARNr 5S a été utilisé comme modèle d'étude dans des recherches portant sur l'analyse des structures ARN. De plus, l'ARNr 5S est largement utilisé comme marqueur phylogénétique. Malgré l'accumulation de données produites par ces études, le rôle intrinsèque de

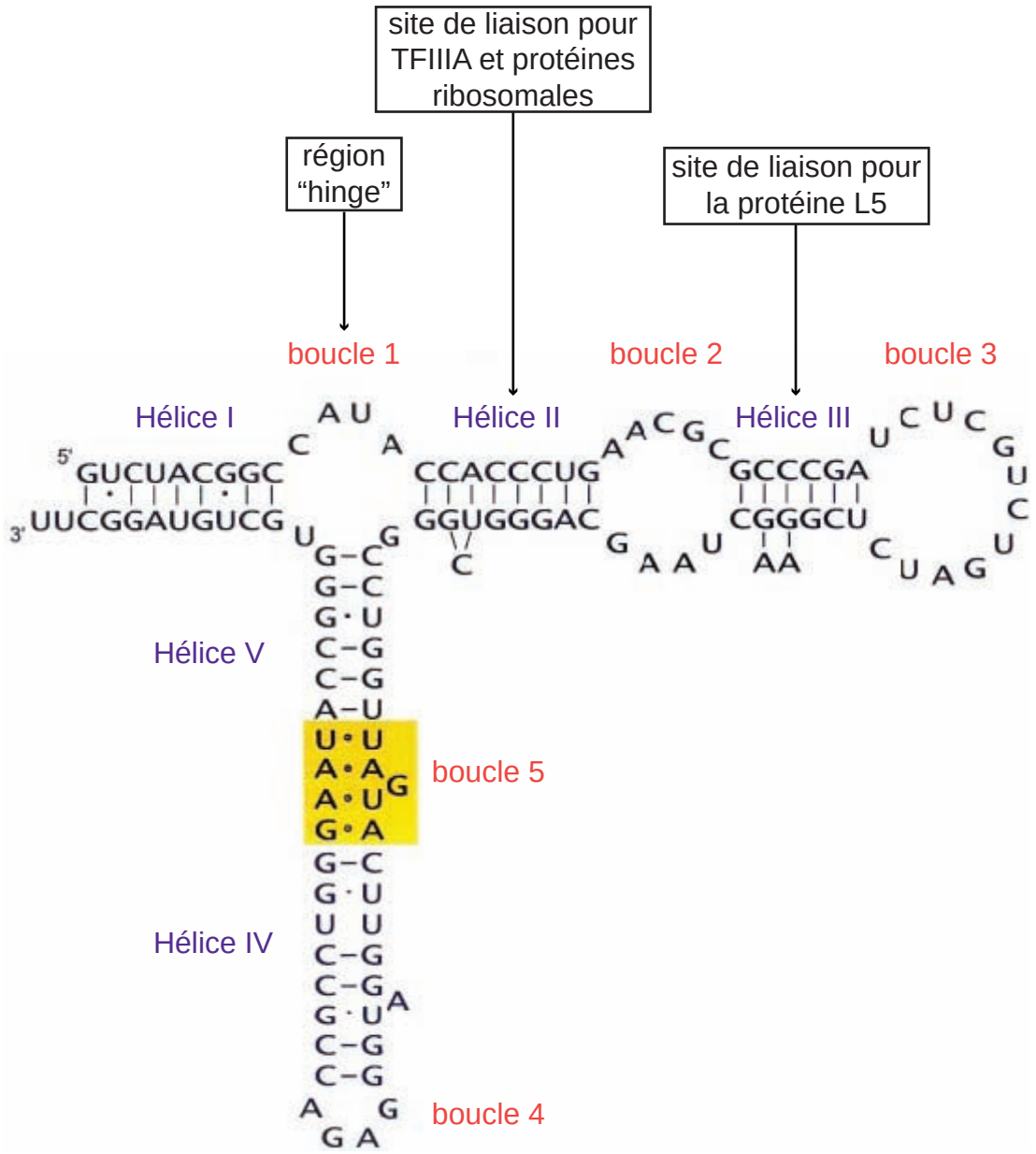


Figure 2: Structure secondaire de l’ARNr 5S chez l’Homme.
D’après Szymanski et al. (2002).

l'ARNr 5S est mal défini. Des expériences de « cross-linking » ont tout de même permis de suggérer une fonction de transduction de signal entre les domaines peptidyltransférase et translocase de la grande sous-unité ribosomale (Dokudovskaya et al., 1996; Huber et al., 2001). Un rôle lui a également été attribué dans la stabilisation de la grande sous-unité ribosomale (Holmberg et Nygard, 2000).

D'un point de vue structurel, l'ARNr 5S se présente sous la forme d'une molécule de 120 nucléotides qui adopte une structure secondaire comprenant 5 hélices et 5 boucles (dont une sert de charnière – région hinge). Au niveau tridimensionnel, l'hélice I présente des similarités avec les ARNt (Betzel et al., 1994); l'hélice II forme un site de liaison pour les protéines ribosomales et le facteur de transcription TFIIIA (Xiong et Sundaralingam, 2000); l'hélice III permet une liaison hautement spécifique à la protéine ribosomale L5 (Huber et al., 2001) (Figure 2).

Du fait de sa taille réduite et de sa capacité à former des complexes avec des protéines ribosomales hors du ribosome, l'ARNr 5S a servi de modèle d'étude pour les interactions ARN-protéines. De manière évidente, les protéines ribosomales sont les cibles privilégiées de l'ARNr 5S, mais il a également été montré qu'il est capable d'interagir avec des protéines non-ribosomales et notamment TFIIIA. Le cas des liaisons avec la protéine ribosomale L5 et le facteur de transcription TFIIIA sont développés ci-dessous.

Hormis sa capacité à reconnaître spécifiquement le promoteur des gènes d'ARNr 5S, TFIIIA possède la particularité de lier le transcrit 5S. Dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, une fois l'ARNr 5S transcrit, il est pris en charge par TFIIIA, formant ainsi le complexe 7S RNP, pour permettre l'export de l'ARNr 5S vers le cytoplasme. La particule 7S RNP est également considérée comme la forme permettant de stocker l'ARNr 5S dans le cytoplasme. En vue de l'assemblage du ribosome, l'ARNr 5S doit être dirigé vers le nucléole, or le retour dans le noyau n'est possible que sous la forme 5S RNP, c'est-à-dire associé à la protéine L5 (Allison et al., 1991; Guddat et al., 1990). Un échange entre TFIIIA et L5 est donc opéré dans le cytoplasme. TFIIIA, ainsi libéré de l'ARNr 5S, peut retourner dans le noyau pour activer la transcription. La biosynthèse de l'ARNr 5S est donc étroitement liée à la quantité de protéine L5 présente dans le cytoplasme. Ce système de liaison différentielle (TFIIIA ou L5) pourrait donc être un moyen indirect de réguler la transcription de l'ARNr 5S en jouant sur la quantité de TFIIIA libre, donc disponible pour la transcription. Il a en effet été rapporté chez le Xénope que la surexpression de L5 entraîne une

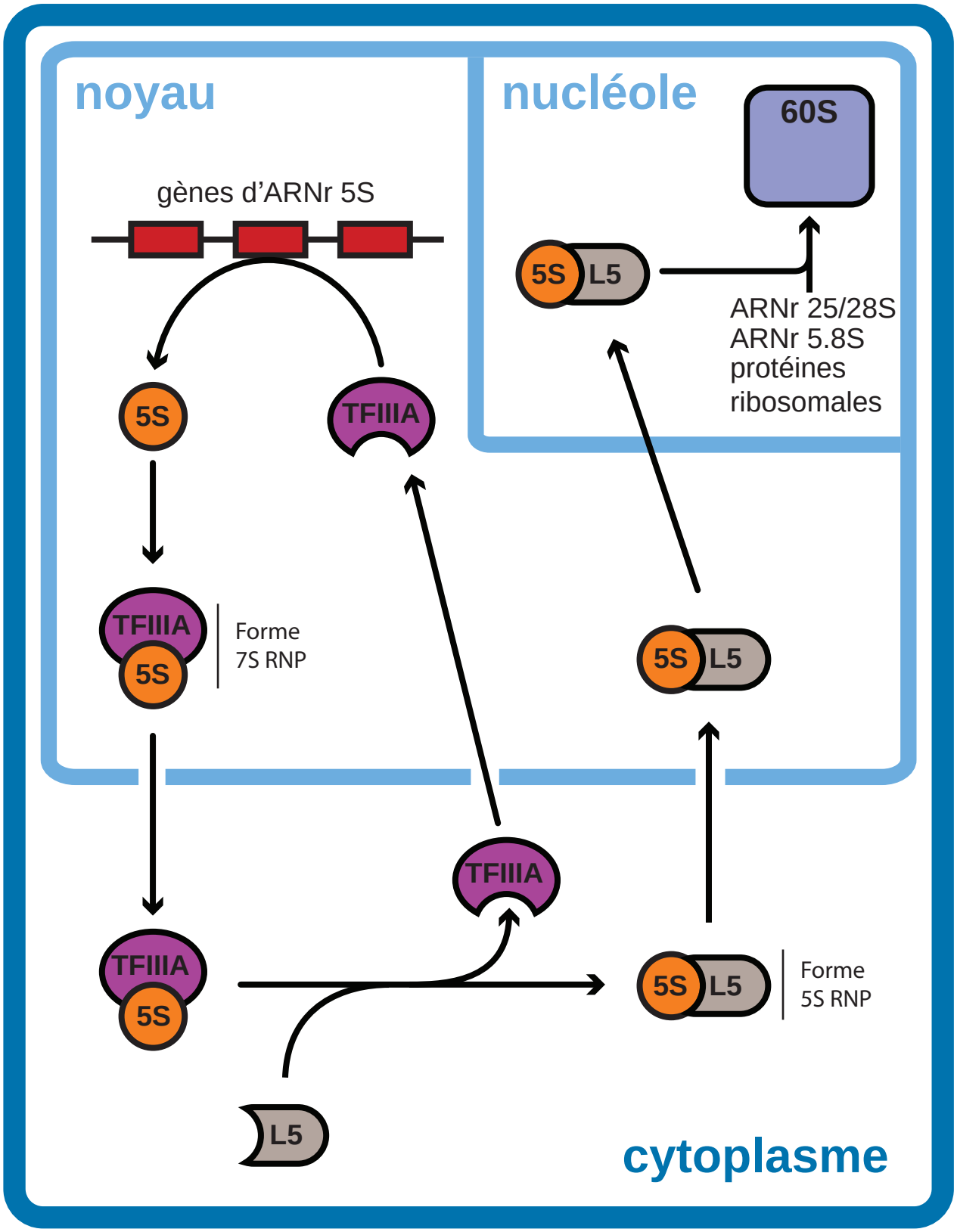


Figure 3: Interactions de l'ARNr 5S avec les protéines TFIIIA et L5 dans l'ovocyte de *Xenopus laevis.* Les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par le complexe de transcription ARN polymérase III incluant notamment la protéine TFIIIA. Puis TFIIIA lie spécifiquement l'ARNr 5S et assure son export vers le cytoplasme. L'ARNr 5S est ensuite pris en charge par la protéine L5 pour être importé dans le nucléole où il sera associé à la grande sous-unité ribosomale 60S. D'après Szymanski et al. (2003).

augmentation de transcription des gènes d'ARNr 5S (Pittman et al., 1999; Brow, 1987) (Figure3).

3.Les gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

3.1.Structure

Les gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana* sont organisés en unités de 500 paires de bases (pb) composées d'une région transcrite de 120 pb et d'une région intergénique. Les séquences promotrices permettant de recruter le complexe ARN polymérase III se trouvent à l'intérieur de la séquence transcrite, mais les séquences intergéniques portent tout de même des motifs nécessaires à une transcription efficace.

3.1.1.Le promoteur interne

Les séquences promotrices internes du gène d'ARNr 5S sont constituées de régions de contrôle distinctes séparées par des éléments non essentiels à la transcription. Trois régions ont été décrites chez *Xenopus laevis* : une boîte A, un élément intermédiaire et une boîte C. Ces trois éléments sont nécessaires et suffisants au recrutement de l'ARN polymerase III et des facteurs de transcription TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC (Pieler et al., 1987). Par analogie de séquence avec les données obtenues chez *Xenopus laevis* (Bogenhagen et al., 1980; Sakonju et Brown, 1982; Pieler et al., 1987), les éléments constituant le promoteur interne du gène d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana* ont pu être définis : la boîte A se situe entre les positions +51 et +62 par rapport au site d'initiation de transcription, l'élément intermédiaire est retrouvé entre les positions +71 et +72, la boîte C entre les positions +81 et + 90 (Cloix et al., 2000).

Il est important de noter que cette organisation avec promoteur interne tripartite n'est pas une constante chez les gènes transcrits par l'ARN polymérase III. En effet, ce type de promoteur, dit de type I, est retrouvé exclusivement pour les gènes d'ARNr 5S. Parallèlement, deux autres types de promoteur utilisés par cette polymérase sont observés. Les promoteurs de type II, les plus couramment utilisés

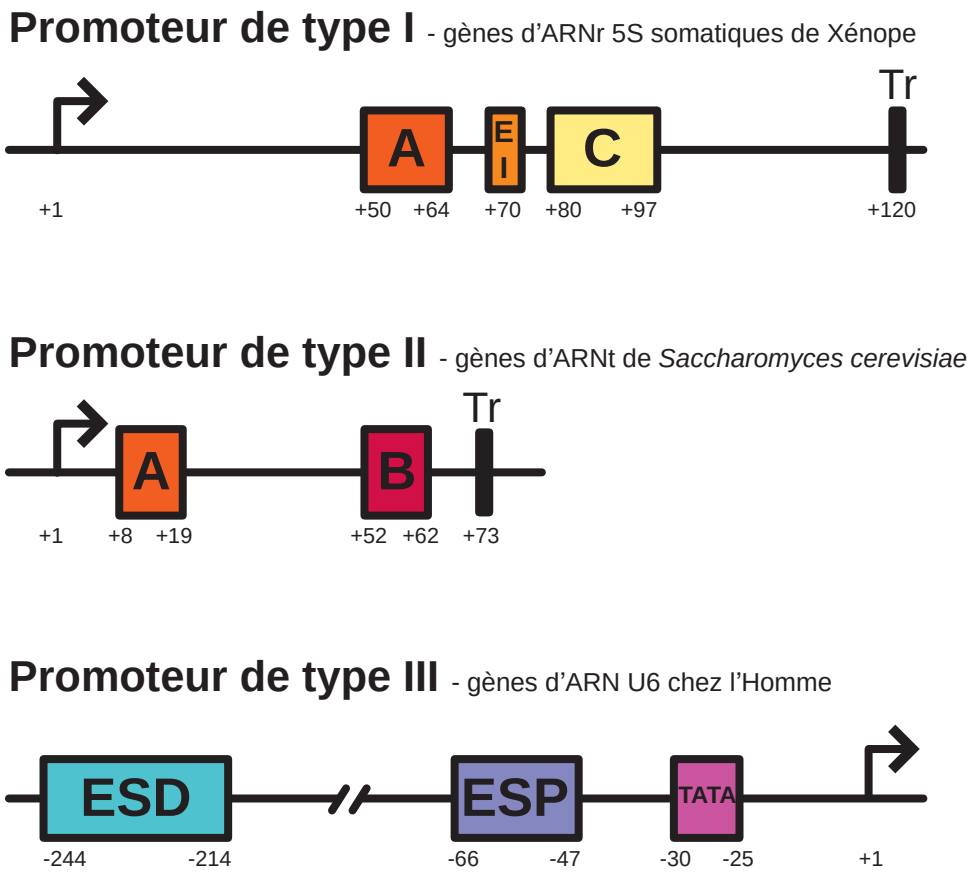


Figure 4: Organisation des trois types de promoteur utilisés par l'ARN polymérase III. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par +1 et le site de terminaison par Tr. Les séquences promotrices des promoteurs de type I incluent les boîtes A et C ainsi qu'un élément intermédiaire noté EI. Dans les promoteurs de type II, la boîte C est substituée par une boîte B. Enfin, les promoteurs de type III sont composés des éléments de séquence distal (ESD), proximal (ESP) et d'une boîte TATA. D'après Paule et White (2000).

dans les systèmes ARN polymérase III, sont constitués de deux boîtes internes à la séquence transcrite. Ces derniers sont notamment utilisés pour la transcription des gènes d'ARNt. Les promoteurs de type III quant à eux sont beaucoup moins fréquents puisque retrouvés occasionnellement chez les vertébrés (le mieux décrit d'entre eux étant le promoteur du gène U6 humain). Ici aussi, les séquences promotrices sont tripartites, mais à la différence des promoteurs de type I, sont situées en amont de la séquence transcrite (Figure 4).

3.1.2.Région intergénique en amont du site d'initiation de transcription

De nombreuses expériences *in vitro*, réalisées notamment chez *Bombyx mori* (Morton et Sprague, 1984), *Caenorhabditis elegans* (Nelson et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (Sharp et Garcia, 1988) ont permis de montrer que la région en amont de la région transcrite est requise pour une transcription efficace des gènes d'ARNr 5S. Chez *Xenopus laevis*, même si ces séquences ne semblent pas être un élément nécessaire à la transcription *in vitro*, elles sont indispensables pour permettre une initiation précise par l'ARN polymérase III. Une étude *in vivo*, toujours chez le Xénope, a mis en évidence une implication de cette région dans l'établissement de structures chromatiques distinctes permettant l'expression différentielle des gènes d'ARNr 5S somatiques et ovocytaires (Wolffe, 1994).

À la vue de ces résultats, il apparaît que la transcription ARN polymérase III nécessite la présence d'une région de 26pb contenant un motif TATAT ressemblant à une boîte TATA (motif « TATA-like »). Chez les mammifères, le motif « TATA-like » est remplacé par une région de 12 pb riche en G+C, nommée boîte D, également nécessaire à une transcription efficace par l'ARN polymérase III (Hallenberg et al., 1994; Nielsen et al., 1993).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les éléments régulateurs en 5' de la région transcrite ont été définis par homologie de séquence. Venkateswarlu et al. (1991) ont pu mettre en évidence un motif « TATA-like » entre les positions -28 et -23, un dinucléotide GC en -12 et un résidu C en -1 (Figure 5). Plus tard, des expériences de transcription *in vitro* menées par Cloix et al. (2003) ont permis de démontrer la nécessité de ces séquences et de confirmer leur positionnement. Plus particulièrement, ces travaux

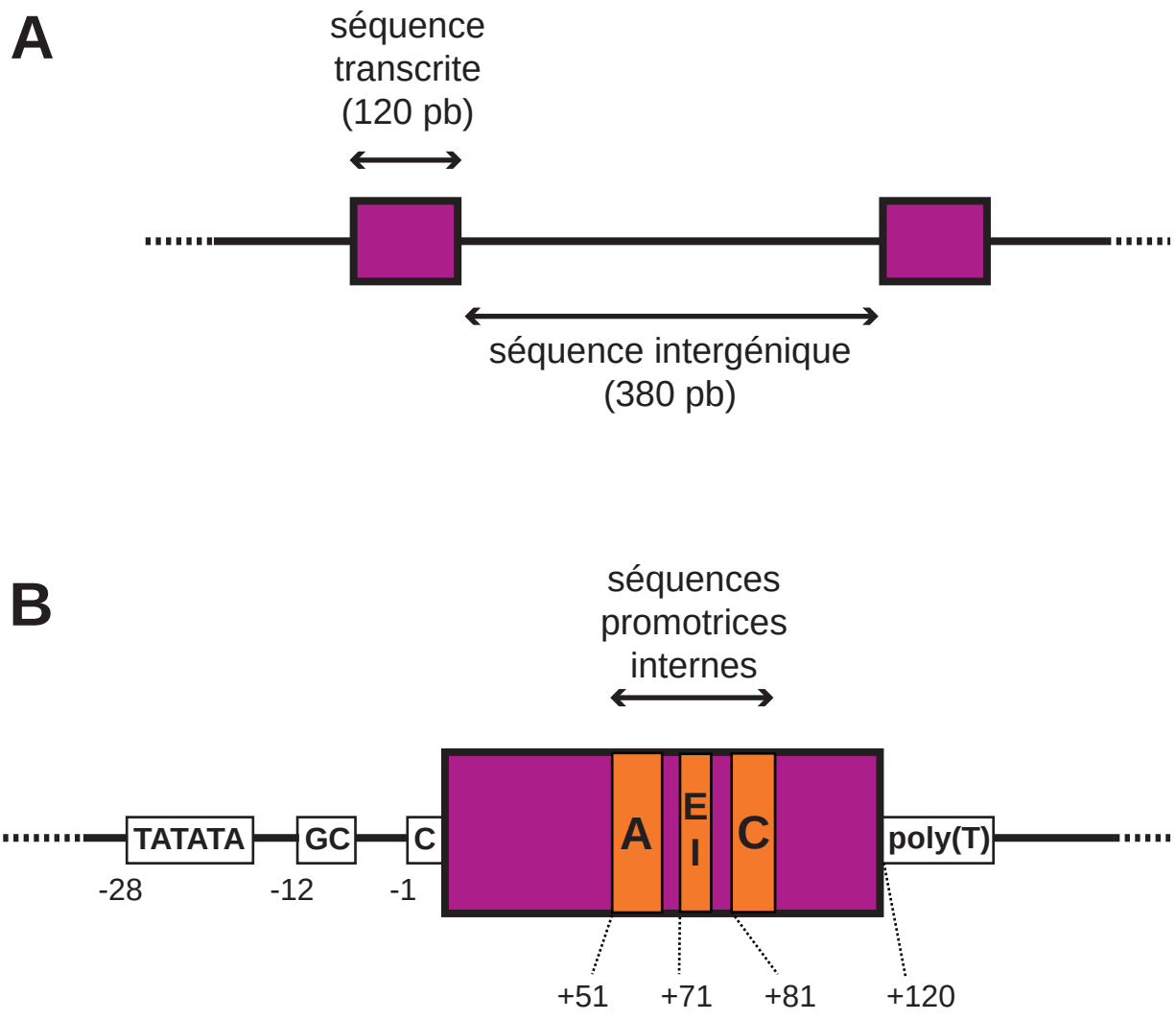


Figure 5: Structure des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana.* (A) Les gènes d'ARNr 5S sont répétés en tandem. Les séquences transcrites de 120 pb sont séparées par des séquences intergéniques de 380 pb. **(B)** Représentation de la séquence transcrite et des régions amont et aval d'un gène d'ARNr 5S. La séquence promotrice interne est composée d'une boîte A, d'un élément intermédiaire (EI) et d'une boîte C.

ont mis en évidence le rôle essentiel du motif « TATA-like » dans la transcription et la ré-initiation de la transcription des gènes d'ARNr 5S.

3.1.3.Région intergénique en aval de la région transcrite

D'un point de vue quantitatif, cette région n'a pas réellement d'impact sur la production d'ARNr 5S. Chez *Arabidopsis thaliana*, immédiatement en aval de la séquence transcrite, un motif est utilisé comme signal de terminaison de transcription par l'ARN polymerase III. Cette séquence se compose d'une répétition de résidus T (ou stretch de T) de longueur et de composition variables (le stretch de T pouvant être en effet interrompu par la présence de résidus A, G ou C). De par cette singularité, il est possible d'identifier clairement l'appartenance de n'importe quel gène d'ARNr 5S à un locus puisque la composition du stretch de T est spécifique de chaque locus (cf. chapitre1 : 3.5.1) (Cloix et al., 2000; Cloix et al., 2002).

3.2.Le complexe de transcription des gènes d'ARNr 5S

L'ARN polymérase III, comme l'ARN polymérase I, n'est dédiée qu'à un nombre limité de gènes. Alors que l'ARN polymerase I produit les ARNr (28S ou 25S chez la plante, 18S et 5.8S), l'ARN polymérase III synthétise les ARNr 5S, les ARNt, l'ARN 7SL, le petit ARN nucléaire U6 (ARNsn U6), différents petits ARN notamment impliqués dans des processus de maturation, et des éléments transposables (Paule et White, 2000). L'activité de ces deux polymérases, malgré la faible variété des cibles, représente près de 80% des transcrits produits dans les cellules en croissance.

La transcription des gènes d'ARNr 5S par l'ARN polymérase III nécessite l'intervention de trois facteurs de transcription : TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC. La majorité des informations disponibles sur le complexe de transcription des gènes d'ARNr 5S ont été obtenues chez *Xenopus laevis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ces deux organismes, les trois facteurs de transcription présentés ci-dessus interagissent de manière séquentielle. TFIIIA se lie spécifiquement au promoteur interne du gène puis TFIIIC et finalement TFIIIB sont recrutés, permettant ainsi le recrutement de l'ARN polymérase III (Bieker et al., 1985; Kassavetis et al., 1990; Setzer et Brown, 1985) (Figure 6).

3.2.1.Le facteur de transcription TFIIIA

Originellement cloné et purifié chez *Xenopus laevis* (Engelke et al., 1980; Ginsberg et al., 1984), TFIIIA est le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S. TFIIIA appartient à la super-famille des protéines à doigts de zinc. En effet, le facteur TFIIIA de *Xenopus laevis* présente 9 doigts de zinc de type Cys2-His2 (Miller et al., 1985) et un domaine nécessaire à l'activation transcriptionnelle situé en position C-terminale (Mao et Darby, 1993).

Les doigts de zinc 1 à 3, en position N-terminale, permettent de lier la boîte C du promoteur des gènes d'ARNr 5S (Clemens et al., 1992; Nolte et al., 1998). Les doigts de zinc centraux, c'est-à-dire de 4 à 6, en adoptant une structure particulière couvrent la région située entre les boîtes A et C, mais seul le doigt 5 est en contact direct avec l'ADN de l'élément intermédiaire (Nolte et al., 1998). Enfin les doigts 7, 8 et 9 lient la boîte A (Clemens et al., 1992).

Depuis sa caractérisation chez le Xénope, TFIIIA a été identifié dans plusieurs organismes incluant d'autres espèces d'amphibiens (Gaskins et Hanas, 1990; Gaskins et al., 1992), l'Homme (Drew et al., 1995), la souris et le rat (Hanas et al., 2002), *Saccharomyces cerevisiae* et *pombe* (Archambault et al., 1992; Schulman et Setzer, 2003). Chez les plantes, ce facteur de transcription a été isolé biochimiquement chez le maïs (Wyszko et al., 1997) et la tulipe (Wyszko et Barciszewska, 1997), cependant seul le TFIIIA d'*Arabidopsis thaliana* a été caractérisé (Mathieu et al., 2003b).

Comme vu précédemment, il a été montré que la protéine TFIIIA est capable de lier les gènes et les transcrits d'ARNr 5S (Polakowski et Paule, 2002; Wyszko et Barciszewska, 1997; Mathieu et al., 2003b). Cette capacité de liaison aux ARNr 5S permettrait notamment de coupler leur transcription à l'accumulation de protéines ribosomales via un réseau d'interactions acides nucléiques-protéines (Pittman et al., 1999).

3.2.2.Le facteur de transcription TFIIIC

Du fait de sa faible affinité pour l'ADNr 5S, TFIIIC a besoin de la fixation préalable de TFIIIA sur le promoteur pour pouvoir être recruté (Conesa et al., 1993; Parsons et Weil, 1992). TFIIIC est parmi l'un des facteurs de transcription les plus

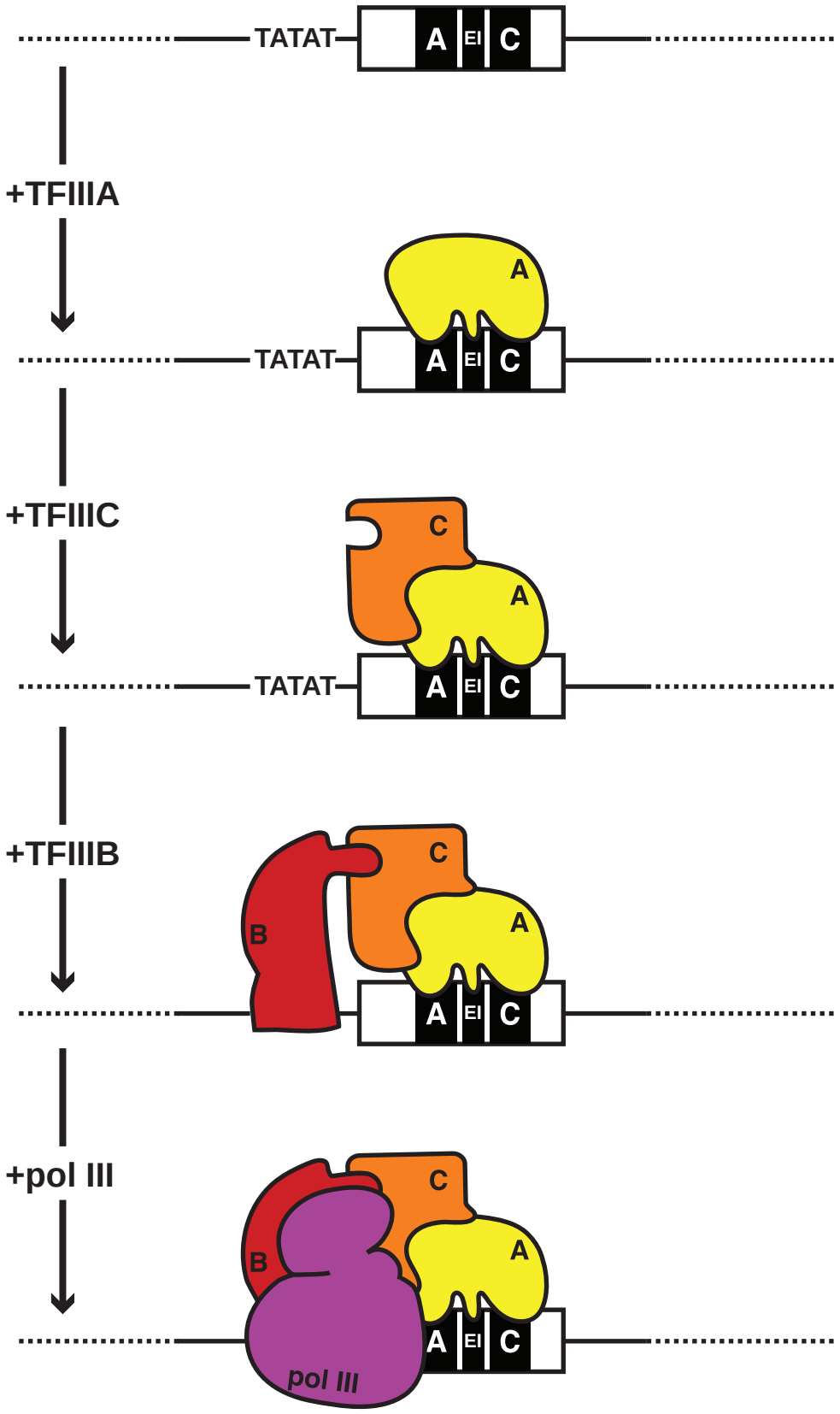


Figure 6: Assemblage du complexe de transcription sur un gène d'ARNr 5S. La fixation de TFIIIA sur le promoteur interne permet la fixation de TFIIIC. La présence de TFIIIA et TFIIIC permet de recruter TFIIIB. Enfin, TFIIIB permet le recrutement de l'ARN polymérase III et donc l'initiation de la transcription.

complexes connus. Chez l'Homme, TFIIIC est composé de neuf sous-unités dont trois d'entre elles possèdent une activité histone acétyltransférase (Wang et Roeder, 1996; Yoshinaga et al., 1987; Kundu et al., 1999; Hsieh et al., 1999). TFIIIC est un co-activateur puisqu'il fait le lien entre la protéine TFIIIA, liée au promoteur, et le complexe protéique TFIIIB reconnu par l'ARN polymerase III.

3.2.3.Le facteur de transcription TFIIIB

TFIIIB, n'ayant pas la capacité de reconnaître directement le promoteur de l'ADNr 5S, est recruté via des interactions protéines-protéines avec TFIIIA et TFIIIC (Paule et White, 2000). Caractérisé en détail chez *Saccharomyces cerevisiae*, TFIIIB est un complexe polypeptidique formé de l'association de la protéine TBP (« TATA-binding protein ») (Kassavetis et al., 1992) avec deux protéines TAF (« TBP-associated factors ») : TAF90 et TAF70 (ou BRF pour « TFIIB-related factor »). TBP a pour fonctions de se fixer à la boîte « TATA-like » (Joazeiro et al., 1994) et de stabiliser la fixation de BRF sur TFIIIC permettant ainsi le recrutement de TAF90 (Kassavetis et al., 1992). TAF90 participe à l'ouverture du promoteur en initiant la séparation des brins d'ADN en amont de la bulle de transcription, et BRF permet sa propagation (Kassavetis et al., 2001). Une fois lié à TFIIIC et au gène d'ARNr 5S, TFIIIB permet le recrutement de l'ARN polymérase III afin d'initier la transcription (Kassavetis et al., 1990).

3.3.Organisation des gènes d'ARNr 5S

Les gènes d'ARNr 5S sont généralement trouvés sous forme de blocs de séquences répétées en tandem en orientation directe. Le nombre de gènes est variable, il peut aller de huit copies chez *Escherichia coli* (Condon et al., 1995) à plus de 60000 chez *Linum usitatissimum* (Schneeberger et al., 1989), en passant par quelques centaines chez l'Homme (Sorensen et Frederiksen, 1991). La localisation et la distribution des gènes d'ARNr 5S sont également variables selon les organismes puisqu'ils peuvent être regroupés en un seul locus ou dispersés en plusieurs loci dans le génome. Chez les procaryotes (Condon et al., 1995) et certains champignons, tels que *Saccharomyces cerevisiae* (Philippsen et al., 1978) ou *Mucor*

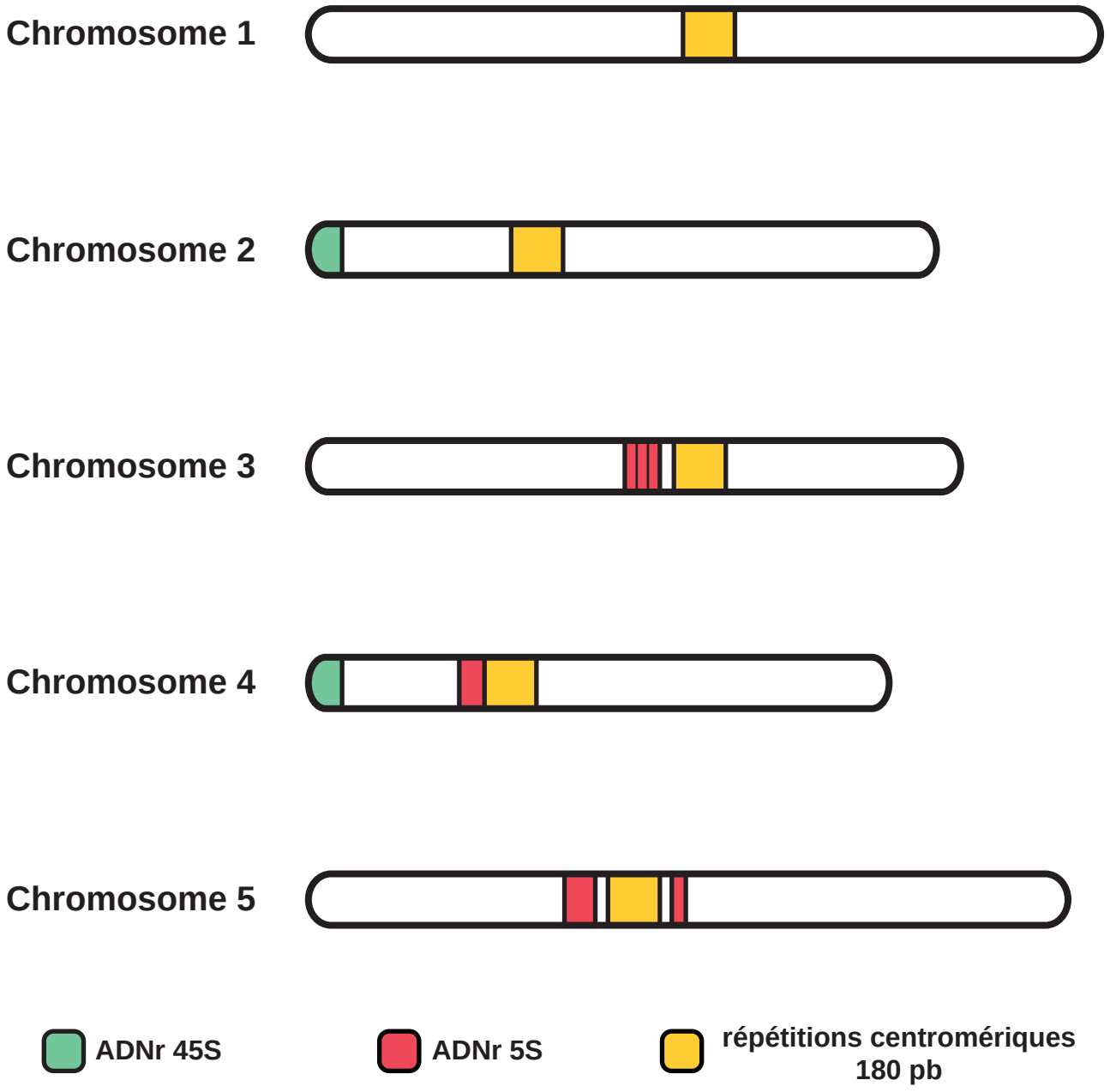


Figure 7: Localisation des blocs d'ADNr 5S, d'ADNr 45S et des répétitions centromériques chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia. Les gènes d'ARNr 5S sont organisés en blocs trouvés sur les chromosomes 3, 4 et 5. Le chromosome 3 porte trois loci sur le bras gauche. Le chromosome 5 porte deux loci: un sur le bras gauche et un sur le bras droit. Les gènes d'ARNr 45S sont situés aux extrémités des bras courts des chromosomes 2 et 4.

racemosus (Cihlar et Sypherd, 1980), les gènes d'ARNr 5S sont retrouvés associés aux autres gènes d'ARNr. A l'inverse, chez la plupart des eucaryotes supérieurs, les gènes d'ARNr 5S ne sont pas physiquement liés aux autres gènes d'ARNr.

3.4.Organisation et localisation des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana possède environ 1000 gènes d'ARNr 5S par génome haploïde, organisés en bloc de répétitions en tandem, représentant 0,7% du génome (Campell et al., 1992). Pour les différents écotypes, la répartition des blocs d'ADNr 5S ainsi que leur polymorphisme chromosomique a pu être étudié grâce à la technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH). Dans tous les écotypes testés, les gènes d'ARNr 5S sont retrouvés sur le bras court du chromosome 4 et sur deux loci du 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). Un autre bloc d'ADNr 5S est présent sur le chromosome 3 notamment dans les écotypes Columbia, Landsberg *erecta* ou Cape Verde Islands, mais absent de C24 et Wassileskija (Fransz et al., 1998). En ce qui concerne la localisation chromosomique, les blocs d'ADNr 5S des chromosomes 4 et 5 se situent en position péricentromérique, et ce quel que soit le contexte génomique. Le cas du bloc du chromosome 3 (quand il est présent) est différent puisque sa localisation est polymorphique entre certains écotypes. Par exemple, dans l'écotype Columbia ce locus 5S est situé dans la région péricentromérique du bras gauche, alors qu'en contexte Landsberg *erecta* il sera retrouvé au milieu du bras droit (Fransz et al., 1998; Tutois et al., 2002) (Figure 7).

3.5.Les gènes d'ARNr 5S sont hétérogènes

Chez *Xenopus laevis*, il a été démontré que deux familles de gènes d'ARNr 5S, réparties sur des loci distincts coexistent : les familles somatique et ovocytaire comprenant respectivement 20000 et 400 copies de gènes d'ARNr 5S (Peterson et al., 1980). Une hétérogénéité des transcrits a également été rapportée chez de nombreux organismes comme, par exemple, les bactéries (Jarry et Rosset, 1971),

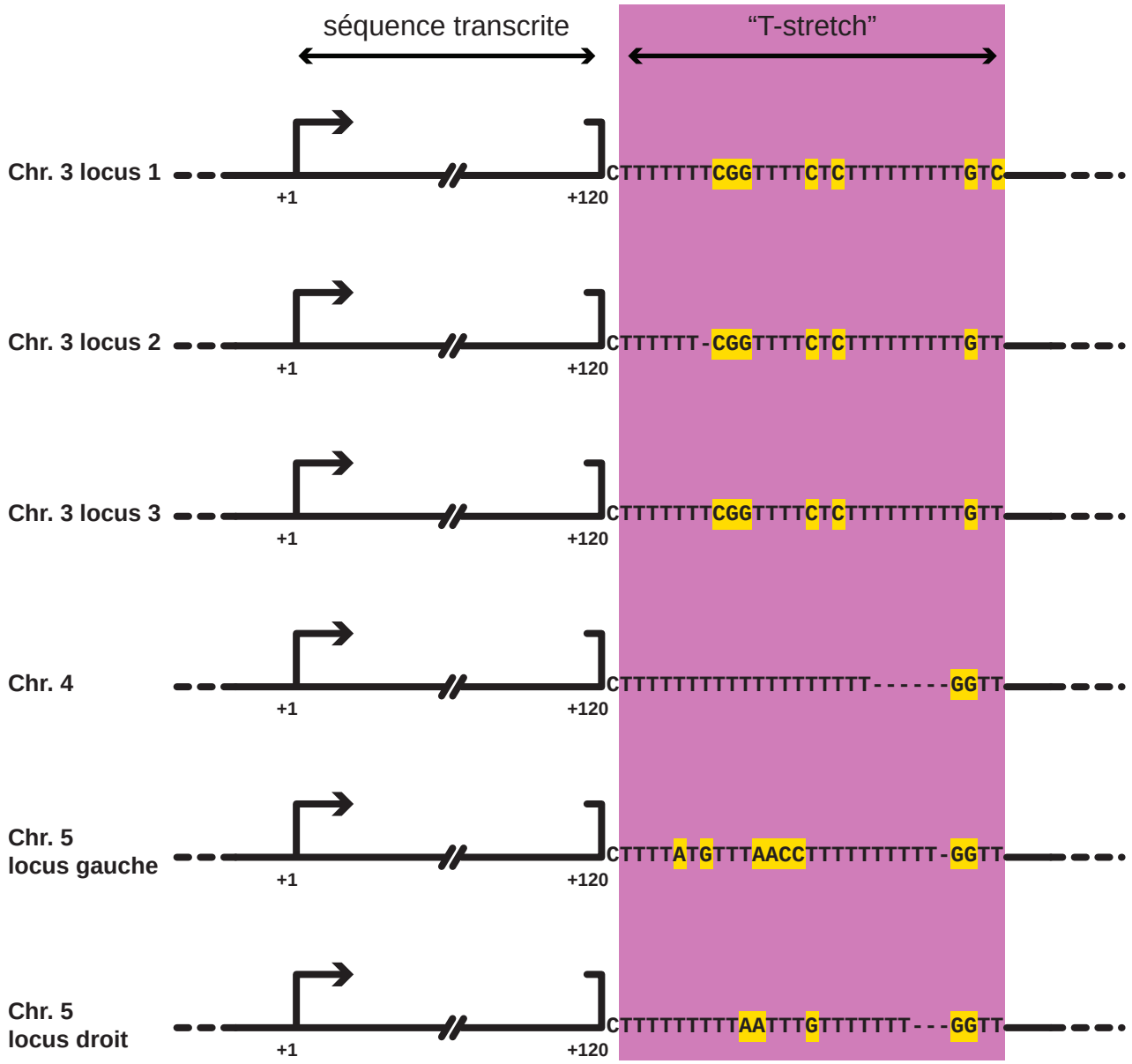


Figure 8: Le "T-stretch" des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia. Les séquences signatures "T-stretch" sont constituées d'une répétition de résidus T dont la longueur et les motifs (encadrés en jaune) qui l'interrompent sont spécifiques à chaque locus.

les champignons (Wildeman et Nazar, 1982), les oiseaux ou les mammifères (Ro-Choi et al., 1971).

3.5.1.Hétérogénéité inter-loci chez *Arabidopsis thaliana*

La cartographie de chromosomes artificiels de levure (YAC, « Yeast Artificial Chromosome ») et de chromosomes artificiels de bactéries (BAC, « Bacteria Artificial Chromosome ») contenant les différents loci génomiques d'ADNr 5S a été réalisée (AGI, 2000; Cloix et al., 2000; Tutois et al., 1999). Afin d'étudier la nature des gènes d'ARNr 5S des différents loci génomiques, ces YAC ont été utilisés comme matrice ADN pour des amplifications PCR utilisant des amorces établies selon la séquence du gène d'ARNr 5S initialement rapportée par Campbell et al. (1992). La séquence des produits PCR obtenus a permis d'établir de nouvelles séquences consensus de gènes d'ARNr 5S spécifiques de chacun des différents loci génomiques d'ADNr 5S (Cloix et al., 2000). Il apparaît à la suite de cette étude que les séquences intergéniques divergent plus vite d'un bloc à l'autre que les séquences transcrites. La différence la plus intéressante est l'existence du polymorphisme de stretch de T (« T-stretch ») spécifique des loci 5S. La longueur du stretch de T ainsi que son interruption par des résidus A, G ou C permet ainsi de connaître l'origine d'un gène (Figure 8).

De plus, à l'aide des réactions PCR décrites ci-dessus, Cloix et al. (2000) ont révélé l'existence de deux types de gènes d'ARNr 5S dans l'écotype Columbia. Les gènes retrouvés majoritairement ont une longueur d'environ 500 pb et des variants plus courts sont représentés par des unités de 251 pb. Ces derniers, présentant une délétion couvrant une partie de la séquence transcrite des gènes d'ARNr 5S, ont uniquement été détectés dans le petit locus du chromosome 5 (Cloix et al., 2000).

Enfin, d'un point de vue transcriptionnel, il apparaît que tous les loci ne participent pas de la même façon à l'accumulation d'ARNr 5S. En effet, des expériences de transcription *in vitro* en cellules de tabac et d'analyses de transcrits présents *in vivo* ont montré que les unités du chromosomes 3 et du petit bloc du chromosome 5, de l'écotype Columbia, n'ont pas la possibilité d'être exprimées. Ceci étant sans doute dû à la présence d'un trop grand nombre de mutations dans ces unités (Cloix et al., 2002).

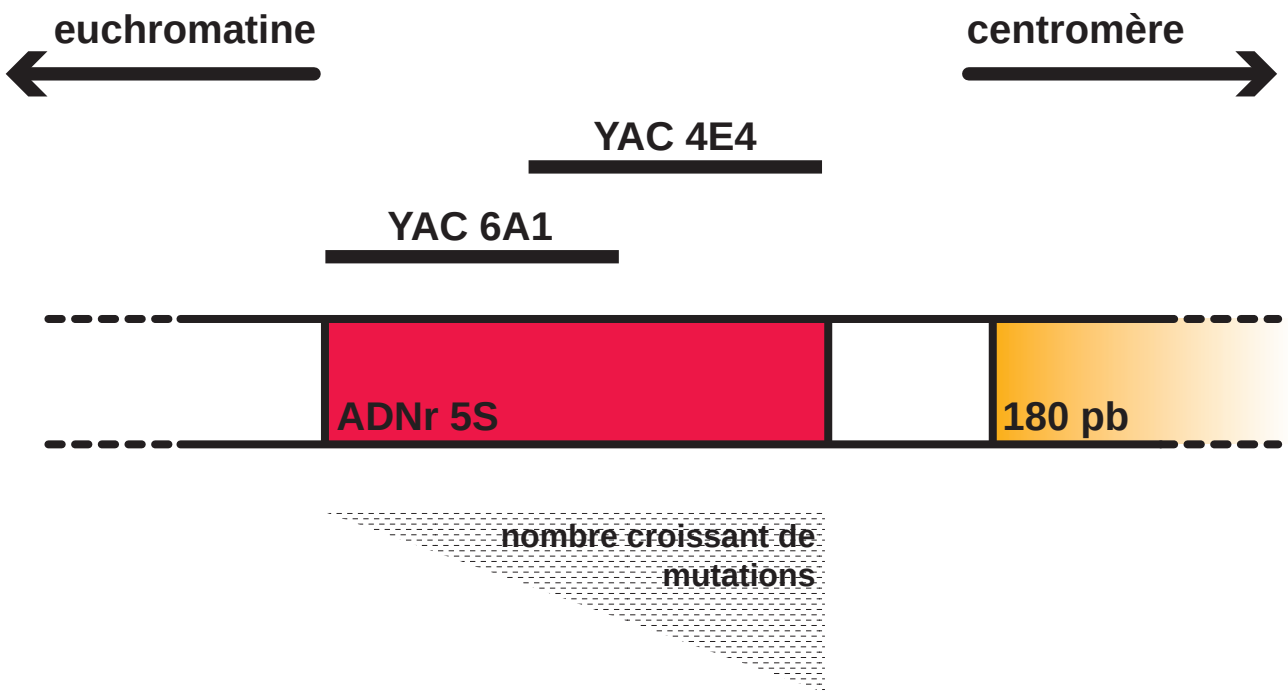


Figure 9: Localisation des YAC 6A1 et 4E4 sur le bloc d'ADNr 5S du bras gauche du chromosome 5. Les chromosomes artificiels de levure 6A1 et 4E4 (YAC 6A1, YAC 4E4) ont été cartographiés sur le bloc d'ADNr 5S. Le YAC 6A1 correspond à la fraction la plus euchromatique du bloc d'ADNr 5S et le YAC 4E4 à la partie la plus hétérochromatique. Le nombre de mutations présentes au sein des gènes d'ARNr 5S augmente lorsque l'on se dirige vers la partie la plus hétérochromatique du bloc.

3.5.2.Hétérogénéité intra-locus chez *Arabidopsis thaliana*

Lors de l'étude de l'expression des gènes d'ARNr 5S, des expériences de RT-PCR spécifiques suivies de séquençage systématique ont été entreprises. Cette étude a tout d'abord révélé l'existence d'une hétérogénéité de la population d'ARNr 5S chez Arabidopsis se traduisant par la présence d'un ARNr 5S dit « majoritaire », et d'ARNr 5S hétérogènes, dit minoritaires, différant du transcrit majoritaire par une ou deux substitutions nucléotidiques. Les transcrits minoritaires sont globalement absents de la plante adulte sauvage et ne sont trouvés que dans certains tissus, stades de développement ou contextes mutants (Mathieu et al., 2003a; Vaillant et al., 2007). Au même titre que les majoritaires, les transcrits minoritaires sont retrouvés dans les polysomes suggérant ainsi leur fonctionnalité (Cloix et al., 2002).

De même, l'analyse des amplifications PCR réalisées sur les YAC portant les loci génomiques d'ADNr 5S a permis de mettre en évidence une plus forte proportion d'unités minoritaires/hétérogènes sur les YAC portant les régions d'ADNr 5S les plus hétérochromatiques. Par exemple, les YAC 6A1 et 4E4 portent la séquence du bloc 5S situé sur le bras gauche du chromosome 5 (Figure 9). Alors que le YAC 6A1 couvre la partie la plus euchromatique de ce bloc, le YAC 4E4 comprend la partie la plus hétérochromatique. Les séquences issues des amplifications PCR révèlent que les unités portées par le YAC 6A1 sont principalement des unités majoritaires ou possédant une à deux mutations. Sur le YAC 4E4, la proportion d'unités majoritaires diminue au profit des minoritaires. De plus les unités minoritaires trouvées sur ce YAC 4E4 peuvent présenter de une à sept mutations. Il existe donc une répartition non aléatoire des unités minoritaires le long d'un bloc. Globalement, il existe un gradient de mutations trouvées dans les gènes d'ARNr 5S. En effet, une augmentation du nombre de mutations est observée le long des blocs 5S lors de la progression du côté euchromatique vers l'extrémité hétérochromatique.

Enfin, il existe probablement un gradient de méthylation des cytosines en position asymétrique dans les blocs d'ADNr 5S. Une des modifications épigénétiques les mieux caractérisées est la méthylation de l'ADN. Chez les plantes, cette méthylation peut intervenir sur les cytosines en contextes symétriques CG, CNG (N pouvant être A, T ou C) et asymétriques CNN alors que chez les mammifères elle n'est trouvée d'une façon générale qu'aux positions CG. En comparant les séquences obtenues par PCR à partir des YAC et en établissant la proportion de cytosines asymétriques

par rapport aux cytosines en contexte symétrique, il est apparu que le grand bloc d'ADNr 5S (couvert par les YAC 6A1 et 4E4) présentait plus de cytosines asymétriques du côté centromérique que du coté euchromatique (Vaillant et al., 2008). Ceci est en accord avec l'observation faite auparavant qui révélait que les unités non-transcrites, *a priori* les plus hétérochromatiques, possédaient un rapport plus élevé en A+T / G+C que les séquences transcrites (Mathieu et al., 2002). Les phénomènes observés concernant les rapports C asymétriques / C symétriques et A+T / G+C peuvent être expliqués par la relative instabilité des 5-méthylcytosines. En effet, la méthylation des cytosines entraîne, au fil des générations, l'apparition de mutations de transition transformant les résidus C méthylés en résidus T. Par exemple, un site 5'-CG-3' méthylé pourra être transformé en 5'-TG-3', et le brin complémentaire deviendra donc 3'-AC-5'. Les conséquences d'un tel phénomène sont la diminution de la proportion de sites CG et CNG par rapport aux sites CNN et l'augmentation de la fréquence des résidus A+T (et donc du rapport A+T / G+C).

3.6.Méthylation des gènes d'ARNr 5S et transcription

Chez les plantes, l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation a permis de mettre en évidence que l'ADNr 5S est méthylé chez le maïs (Mascia et al., 1981), le lupin (Rafalski et al., 1982), le pois (Ellis et al., 1988), le lin (Goldsbrough et al., 1982), le soja (Gottlob-McHugh et al., 1990), le tabac (Fulnecek et al., 1998) et *Arabidopsis thaliana* (Finnegan et al., 1996; Vongs et al., 1993). Chez *Xenopus laevis*, le même type d'analyses a montré que les gènes 5S somatiques et ovocytaires sont fortement méthylés (Sims et al., 1983).

L'impact de la méthylation ADN sur la transcription par l'ARN polymérase III a été analysé pour deux types de gènes transcrits par cette polymérase : un gène d'ARNt^{lys2} de poulet et deux gènes d'ARNr 5S de Xénope, l'un ovocytaire l'autre somatique (Besser et al., 1990). L'ADN de ces gènes a été méthylé artificiellement à l'aide d'une méthyltransférase extraite à partir de foie de rat, méthylant spécifiquement les cytosines en contexte CG, puis injecté dans des ovocytes de Xénope. Les auteurs ont observé que si la méthylation entraîne une diminution du taux de transcription du gène d'ARNt^{lys2} d'environ 80% par rapport à un contrôle non méthylé, elle n'affecte pas le taux de transcription des gènes d'ARNr 5S ovocytaires

et somatiques. La méthylation semble donc avoir des impacts différents sur les gènes transcrits par l'ARN polymérase III.

L'étude de la méthylation des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* par séquençage après une modification de l'ADN au bisulfite de sodium a pu montrer que l'ADNr 5S est fortement méthylé sur les cytosines (79% en moyenne contre 6% pour l'ensemble du génome) et ce quelque soit le contexte (CG, CNG ou CNN) (Mathieu et al., 2002). L'impact direct de la méthylation ADN sur la transcription des gènes d'ARNr 5S a été testé *in vitro*. La méthylation des sites CG (obtenue par l'action d'une méthylase CG-spécifique) n'entraîne pas d'inhibition de sa transcription en extraits nucléaires de cellules de tabac. Inversement, la déméthylation de l'ADNr 5S, obtenue en cultivant les plantes sur un milieu contenant de la 5-aza-cytidine (un inhibiteur de la méthylation des cytosines) n'induit pas d'augmentation du taux global d'ARNr 5S (Mathieu et al., 2002). Il apparaît donc que la méthylation de l'ADNr 5S ne détermine pas, à elle seule, l'expression ou la répression des gènes d'ARNr 5S.

3.7.Répression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S sont présents à hauteur d'environ 1000 copies répétées en tandem par génome haploïde. Pourtant, malgré ce nombre important de copies, seule une fraction est effectivement transcrite. Les blocs d'ADNr 5S situés sur le chromosome 3 et le bras droit du chromosome 5 contiennent des unités comportant un grand nombre de mutations et qui ne sont transcrites ni *in vivo* ni *in vitro*. L'étude des transcrits 5S a montré qu'ils provenaient exclusivement des unités du chromosome 4 et du grand bloc du chromosome 5.

Les analyses de RT-PCR ont révélé que parmi les différents gènes d'ARNr 5S théoriquement transcriptionnellement actifs, seule une fraction d'entre eux était effectivement exprimée dans la plante adulte sauvage. En effet, la fraction des gènes d'ARNr 5S minoritaires (présentant des mutations dans leur séquence transcrite) ne semble pas en mesure de s'exprimer. Des expériences menées *in vitro* ont pu démontrer la stabilité des transcrits minoritaires, de plus, leur présence *in vivo* dans des contextes particuliers (notamment à certains stades de développement ou dans certains tissus) montre que les gènes d'ARNr 5S minoritaires possèdent la capacité d'être transcrits. L'absence de transcrits minoritaires des ARNr 5S totaux chez la plante adulte sauvage est donc due à une inactivation de l'expression des gènes

minoritaires. Ainsi, les travaux de l'équipe se sont tournés vers une possible régulation épigénétique des gènes d'ARNr 5S. Le positionnement péricentromérique des blocs d'ADNr 5S ainsi que leur organisation spécifique en tandem étaient à l'appui d'une telle hypothèse.

La régulation épigénétique des gènes d'ARNr 5S a pu être prouvée en 2003 par Mathieu et al. (2003). Dans cette étude, la transcription des gènes 5S minoritaires a été analysée par RT-PCR en contextes génomiques hypométhylés, dans des plantes traitées à la 5-aza-cytidine et dans le mutant *ddm1* (*decrease in DNA demethylation 1* – il est important de noter qu'au delà de son impact sur la méthylation, DDM1 est avant tout une protéine de remodelage de la chromatine). Cette étude a montré, *in vivo*, une corrélation inverse entre le niveau de méthylation de l'ADNr 5S et la proportion d'ARNr 5S minoritaires. Ces résultats sont contradictoires, dans une certaine mesure, avec ceux obtenus *in vitro* qui indiquaient que la transcription n'était pas affectée par la seule méthylation. Cependant *in vitro*, les unités d'ADNr 5S ne subissent pas les effets de la chromatine, ce qui est en revanche le cas *in vivo*. La répression des gènes d'ARNr 5S minoritaires pourrait donc être en relation avec leur état chromatinien, ce qui a été confirmé par une analyse cytologique. En effet, les expériences de FISH (« Fluorescent *in situ* Hybridization ») ont montré que l'ADNr 5S forme des structures en boucles qui émanent de l'hétérochromatine dans les noyaux provenant de feuilles de plantes adultes. En immunocytologie, ces boucles présentent un taux de méthylation de l'ADN et de la lysine 9 des histones H3 (méthylation H3K9) plus faibles que celui de l'ADNr 5S colocalisant avec l'hétérochromatine. Dans le mutant *ddm1*, les boucles ont une taille plus importante et des gènes minoritaires additionnels sont transcrits. La présence de boucles plus grandes est due à la décondensation de la chromatine engendrée par la mutation *ddm1*. En effet, Soppe et al. (2002) ont rapporté que des séquences péricentromériques ne sont plus localisées dans les chromocentres dans le mutant *ddm1*, exception faite des éléments transposables, contenus dans les dîtes séquences péricentromériques, qui demeurent associés à l'hétérochromatine. A l'intérieur de la fraction hétérochromatique (séquences centromériques et péricentromériques) coexistent des séquences possédant des degrés de répétitivités différents. Selon Fransz et al. (2002), ces alternances de séquences plus ou moins répétées permettraient de structurer la chromatine. Les éléments transposables péricentromériques fortement méthylés seraient les points d'ancrage dans

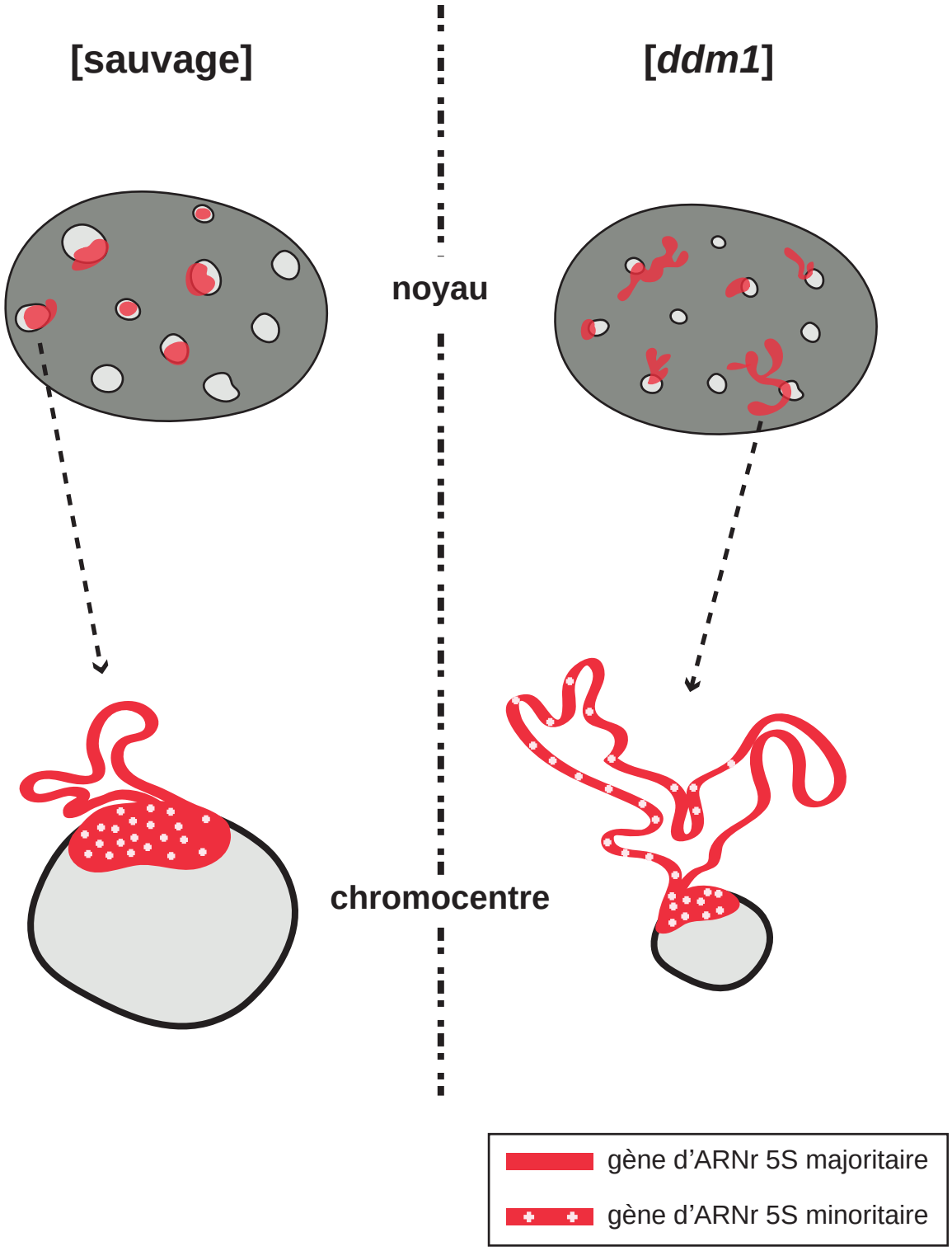


Figure 10: Modèle des boucles d'ADNr 5S. Dans les noyaux de la plante sauvage, les répétitions d'ADNr 5S forment des boucles émanant des chromocentres vers l'euchromatine. Les gènes d'ARNr 5S minoritaires, séquestrés dans l'hétérochromatine, ne peuvent être exprimés contrairement aux gènes majoritaires qui adoptent des caractéristiques euchromatiques. En contexte hypométhylé, comme dans un mutant *ddm1*, les chromocentres sont de plus petite taille et contiennent moins d'ADNr 5S. Dans ces conditions, les boucles d'ADNr 5S, plus grandes qu'en contexte sauvage, permettent la sortie de gènes minoritaires et donc leur expression. D'après O. Mathieu (Thèse, 2003).

l'hétérochromatine des séquences péricentromériques moins méthylées ou des régions riches en gènes, définissant ainsi les boucles euchromatiques.

Par analogie, un modèle (Figure 10) a été déduit pour l'organisation de l'ADNr 5S, dans lequel les gènes 5S majoritaires formeraient des boucles qui sortiraient de l'hétérochromatine mature et adopteraient une structure euchromatique afin d'être exprimés. Les gènes 5S minoritaires seraient, quant à eux , en grande partie séquestrés dans l'hétérochromatine et donc réprimés. En contexte *ddm1*, les boucles plus grandes contiendraient des gènes minoritaires qui auraient la capacité d'être exprimés.

Chapitre 2 :
Les modifications de l’ADN et des histones

Différentes modifications biochimiques peuvent modifier l'état de la chromatine. Ces marques, qualifiées d'épigénétiques, n'altèrent pas l'intégrité de la séquence nucléotidique et confèrent à l'expression génique les potentialités de réversibilité ou d'héritabilité au cours des générations cellulaires. La transmission d'un état épigénétique passe principalement par la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

1.La méthylation de l'ADN

La méthylation ADN et les ADN méthyltransférases (les protéines en charge de cette méthylation) sont présentes chez la plupart des eucaryotes. Les 5-méthylcytosines sont les bases modifiées les plus fréquemment retrouvées. La méthylation des cytosines est impliquée dans une grande variété de phénomènes incluant la régulation de l'expression ou la répression des gènes, le phénomène d'empreinte parentale (ou « imprinting »), la formation de structures chromatiniennes, le verrouillage transcriptionnel de transgènes et d'éléments transposables. Le taux de méthylation des génomes est variable durant l'évolution. En effet, alors que les génomes des vertébrés sont méthylés à hauteur de 3 à 8%, ceux des plantes se situent dans une moyenne de 20 - 30%. Cependant la méthylation de l'ADN des plantes est très variable selon les espèces puisque, par exemple, *Arabidopsis thaliana* a un taux estimé à 6% contre 35% chez le tournesol (Wagner et Capesius, 1981). Enfin, la méthylation ADN est inexistante chez des organismes tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccaromyces pombe* et *Caenorhabditis elegans*.

1.1.Les ADN méthyltransférases

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est surtout restreinte aux séquences symétriques CG, bien que d'autres contextes soient méthylés dans des cellules souches embryonnaires de souris (Bird, 2002; Ramsahoye et al., 2000). Chez les plantes, cette méthylation intervient dans des contextes symétriques CG et CNG ou asymétriques CNN (où N peut être A, T, ou C).

1.1.1.MET1 (METHYLTRANSFERASE1)

La première ADN méthyltansférase clonée chez les eucaryotes fut DNMT1 (DNA-METHYLTRANSFERASE1). Ciblée sur les fourches de réplication, elle possède une forte affinité pour les sites hémiméthylés et intervient dans la méthylation de maintenance, mais elle possède également une faible activité de *novo* (Bestor, 1988; Yoder et al., 1997; Leonhardt et al., 1992).

MET1, le premier gène de plante codant pour une ADN méthyltransférase fut isolé chez *Arabidopsis thaliana* par une approche PCR en utilisant des amorces dessinées à partir des domaines conservés de DNMT1 et de méthyltransférases procaryotes (Finnegan et al., 1993). L'étude de l'impact de *MET1* sur la méthylation ADN d'*Arabidopsis thaliana*, utilisant des mutants ainsi qu'une stratégie antisens, a permis de mettre en évidence une large implication de la méthyltransférase sur des séquences uniques et répétées. MET1 possède une préférence pour les sites CG, et dans une moindre mesure CNG (Finnegan et al., 1993; Ronemus et al., 1996; Kankel et al., 2003). La difficulté à restaurer le patron de méthylation après ségrégation de la construction antisens ainsi que les similarités de séquences entre MET1 et DNMT1 suggèrent que MET1 possède une activité de maintenance de la méthylation aux positions CG et CNG.

De plus, Aufsatz et al. (2004) suggèrent que MET1 soit nécessaire à l'établissement complet du patron de méthylation aux positions CG. Ceci impliquerait une activité *de novo* en plus de l'activité de maintenance.

1.1.2.CMT3 (CHROMOMETHYLASE3)

La classe des méthyltransférases à chromodomaines n'est retrouvée que chez les plantes. Le chromodomaine étant théoriquement dédié au ciblage des régions hétérochromatiques (Platero et al., 1995), il est probable que ces méthyltransférases aient un rôle prépondérant dans la méthylation de ces séquences. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour trois protéines de ce type, CMT1, CMT2 et CMT3. Dans l'écotype Columbia, la présence d'une mutation dans la séquence transcrite du gène *CMT1* entraîne la terminaison prématurée de la traduction de l'ARNm. A ce jour, la protéine CMT1 est donc considérée non fonctionnelle (Henikoff et Comai,

1998). Les gènes CMT2 et CMT3 sont transcrits mais seule la fonctionnalité de CMT3 a été démontrée (Lindroth et al., 2001) (Bartee et al., 2001).

La caractérisation de la fonctionnalité de CMT3 a été réalisée à l'aide de deux cribles distincts. Dans le premier crible, Lindroth et al. ont recherché des mutations suppressives de l'inactivation du gène *SUPERMAN*, impliqué dans le développement floral. Dans certains contextes génomiques, le gène *SUP* subit une hyperméthylation de sa séquence conduisant à son inactivation. L'allèle *SUP* hyperméthylé, aux positions symétriques (CG et CNG) et asymétriques, est alors dénommé *clark kent* (*clk*). La réalisation d'une mutagenèse a permis d'identifier la mutation *cmt3* comme étant suppressive de l'allèle *clk* stable (*clk-st*). L'allèle *clk-st* a été créé par l'introduction d'un locus *SUP* additionnel dans des plantes *clk*, le but étant de contourner le phénomène de réversion observé pour l'allèle *clk*. Il est apparu que la mutation *cmt3* entraîne une déméthylation massive des positions CNG du gène *SUP* mais également de transposons (*Athila et Ta3*) ou des répétitions centromériques 180 pb. *cmt3* entraîne également une déméthylation variable des positions CNN mais n'a aucun effet sur les positions CG (Lindroth et al., 2001).

Dans le second crible, des suppresseurs de « silencing » du gène *PAI2* (*PHOSPHORYBOSYLANTHRANILATE2*) ont été recherchés (Bartee et al., 2001). *PAI2* code pour une protéine intervenant dans la voie de biosynthèse du tryptophane. Dans certains écotypes d'*Arabidopsis thaliana* possédant quatre gènes *PAI*, le gène *PAI2* est inactivé du fait d'une forte méthylation des sites CG, CNG et asymétriques. La mutation du gène *CMT3*, entraînant une déméthylation CNG et CHH, permet la réactivation de PAI2.

1.1.3.DRM (« Domains Rearranged Methyltransferases »)

Les gènes *DRM1* et *DRM2* d'*Arabidopsis thaliana* ont été décrits comme ayant un fort taux de conservation de séquence avec DNMT3, une méthyltransférase *de novo* de mammifères (Cao et al., 2000). Afin de tester l'activité méthyltransférase *de novo* des produits des gènes *DRM*, des plants d'*Arabidopsis* ont été transformés avec un transgène contenant le gène *FWA*. L'expression ectopique de *FWA* est connue pour induire des retards dans le phénomène de floraison de la plante. La méthylation de deux séquences répétées de type SINE (« Short Interspersed Nuclear Element ») contenues dans le promoteur de *FWA* entraîne son inactivation.

Quand des plantes sauvages sont transformées avec un transgène apportant une copie supplémentaire du gène *FWA*, les répétitions contenues dans le promoteur du transgène deviennent méthylées *de novo* et l'expression du transgène est inactivée (Soppe et al., 2000). Cependant, si ce même transgène *FWA* est introduit dans une plante en contexte *drm1 drm2*, la méthylation *de novo* n'a pas lieu et la méthylation préexistante du promoteur endogène n'est pas affectée (Cao et Jacobsen, 2002b).

La mutation *drm1* seule n'est pas en mesure de bloquer la méthylation *de novo* du transgène. DRM2 est donc majoritairement responsable de l'activité de méthylation *de novo* chez *Arabidopsis thaliana*, cependant un rôle mineur de DRM1 n'est pas exclu. De plus, DRM2 intervient dans la maintenance de la méthylation des positions CNG et CNN, mais la séquence satellite centromérique 180 pb ne semble pas concernée par cette activité (Cao et Jacobsen, 2002b; Cao et Jacobsen, 2002a).

Cependant des petits ARN de 24 nt dépendants de RDR2 et DCL3 correspondant aux répétitions 180 pb ont pu être mis en évidence (May et al., 2005). Ce groupe de petits ARN étant connus pour diriger la méthylation par DRM, la régulation d'une fraction des répétitions centromériques par DRM ne peut être exclue.

1.1.4.DDM1 (« Decrease in DNA Methylation 1 »)

Les plantes *ddm1* présentent une méthylation réduite de 70% par rapport à la plante sauvage. Cette hypométhylation touche aussi bien les positions CG que les CNG, en revanche elle ne semble pas affecter la méthylation *de novo*. *DDM1* code une protéine de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF2. Des études *in vitro* ont permis de lui attribuer des activités ATPase et de repositionnement des nucléosomes (Vongs et al., 1993; Jeddeloh et al., 1999; Brzeski et Jerzmanowski, 2003). Ainsi, l'effet de DDM1 sur la méthylation ADN serait indirect. Son rôle consisterait en effet à faciliter l'accès des méthyltransférases à l'ADN. Ces résultats suggèrent également une implication de DDM1 aux côtés des systèmes de méthylation de maintenance et une indépendance vis-à-vis de la méthylation *de novo* instaurée par la voie des petits ARN.

2.Modifications post-traductionnelles des histones

Dans le noyau, l'association de l'ADN et des histones sous forme de nucléosomes constitue la chromatine. Deux types de chromatine sont distingués : l'euchromatine présentant une structure peu compacte et l'hétérochromatine représentant les régions fortement condensées. Chaque nucléosome est constitué de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, lui-même formé de l'association de quatre protéines histones différentes : un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B. Les histones sont formées d'un domaine globulaire et d'une partie N-terminale, la « queue » d'histone, émergeant du nucléosome. Les queues d'histones sont primordiales à la régulation de l'architecture chromatinienne puisque les informations qu'elles portent sont responsables de la modulation des interactions ADN-histones, et donc de la dynamique de remodelage de la chromatine. Ces informations sont basées sur des modifications covalentes établies de manière post-traductionnelles. Ces modifications incluent l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation ou bien encore l'ADP-ribosylation (Strahl et Allis, 2000; Turner, 2000).

2.1.L'acétylation des histones

L'acétylation des histones est réalisée par les histone acétyltransférases (HAT) et survient principalement sur les lysines (K) en position 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3, et sur les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4. L'acétylation des histones est réversible, cette modification est retirée par les histones déacétylases (HDAC). Alors que l'hyperacétylation est associée à une structure ouverte de la chromatine et une activation de l'expression des gènes, l'hypoacétylation induit une compaction et la répression de la transcription (Turner, 2000; Bird et Wolffe, 1999). L'acétylation pourrait affaiblir l'interaction histone-ADN en modifiant la charge électrostatique des histones, déstabilisant ainsi le nucléosome et permettant donc aux facteurs de transcription d'accéder à l'ADN. Il est également proposé que l'acétylation agisse comme un signal spécifique pour le recrutement de protéines diverses par les histones.

Chez les plantes, on distingue quatre familles de HAT (GNAT/MYST, p300/CBP, $TAF_{II}250$, GCN5) et trois familles de HDAC (RPD3/HDA, SIR2, HD2) (Pandey et al., 2002; Bertrand et al., 2003). HDA6, de la famille des HDAC RPD3/HDA, est notamment impliquée dans le renforcement du « silencing » de séquences répétées et le maintien de la méthylation CG en partenariat avec MET1 (Aufsatz et al., 2002b; Probst et al., 2004). De même, une hypométhylation de l'ADNr 5S ainsi qu'une dérépression de gènes d'ARNr 5S minoritaires ont pu être observés lors de travaux réalisés par l'équipe (Vaillant et al., 2007).

Le cas HDA6 est un exemple d'interconnection entre la méthylation et la déacétylation des histones, mais ce n'est pas le seul. En effet, chez les vertébrés, il a été décrit que les protéines MBD (« Methyl Binding Domain ») et MeCP (« Methyl-CG-binding Protein ») servent d'adaptateurs entre la méthylation ADN et les complexes histones déacétylase (Ng et al., 1999; Jones et al., 1998). Les complexes MBD/MeCP-HDAC identifiés dans les cellules de mammifères agissent localement sur l'acétylation des histones en se guidant grâce à la méthylation ADN (Dobosy et Selker, 2001). Toujours chez les mammifères, le complexe multiprotéique NoRC (« Nucleolar Remodeling Complex ») recrute les ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3 ainsi que HDAC1 sur les gènes d'ARNr 45S inactivés (Santoro et al., 2002). Enfin, l'utilisation de la trichostatine A, un inhibiteur des HDAC, entraîne une déméthylation ADN des gènes d'ARNr 45S (Santoro et al., 2002).

2.2.Méthylation des histones

Chez les eucaryotes, de nombreux mécanismes sont responsables de la formation et de la maintenance des structures hétérochromatiques, et parmi eux la méthylation des histones est d'une importance toute particulière.

La méthylation des histones est dirigée par différentes enzymes possédant des activités histones méthyltransférases (HMT). Les premiers gènes identifiés codant pour des protéines à activité HMT furent les gènes de mammifères *SUV39h1* et *SUV39h2*, homologues du gène suppresseur de variégation chez la drosophile *SU(VAR)3-9* (Rea et al., 2000). A ce jour, dix gènes codant pour des homologues de SU(VAR)3-9 ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Baumbusch et al., 2001). Les histones H3 et H4 peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés (me1, me2 ou me3) sur les lysines (K) de la queue N-terminale. Les méthylations des histones

Méthylation histone	Euchromatine	Hétérochromatine
H3K4	me1, me2, me3	
H3K9	me3	me1, me2
H3K27	me3	me1, me2
H4K20	me2, me3	me1

Tableau 1: La méthylation des histones chez *Arabidopsis thaliana*. Les histones peuvent être mono-, di- ou triméthylés (respectivement me1, me2 et me3). Ces marques sont spécifiques soit de l'euchromatine, soit de l'hétérochromatine.

interviennent aux positions H3K4, H3K9, H3K27 ou H4K20 et ont des impacts différents selon le niveau de méthylation (me1, me2 ou me3), la position de la lysine touchée ou l'organisme concerné. Par exemple, chez les mammifères, la méthylation H3K9me3 (dirigée par SUV39h1 et SUV39h2) est trouvée dans les régions hétérochromatiques péricentromériques et dans des séquences transcriptionnellement inactives (Lehnertz et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, c'est la méthylation H3K9me2 qui est associée à la formation de l'hétérochromatine alors que la méthylation H3K9me3 est quant à elle considérée comme une marque euchromatique (Fuchs et al., 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la méthylation H3K9me2 est mise en place notamment par les HMT KRYPTONITE (SUVH4), SUVH5 et SUVH6. La génération d'un triple mutant *kyp*/*suvh4 suvh5 suvh6* conduit à une perte de méthylation ADN (notamment de l'ADNr 5S), de méthylation H3K9 et à une réactivation d'éléments transposables (Jackson et al., 2002; Ebbs et al., 2005; Ebbs et Bender, 2006; Jasencakova et al., 2003). Tout comme l'acétylation, la méthylation des histones est donc connectée à la méthylation ADN. Pour exemple, la méthylation CNG a été décrite comme étant liée à la méthylation H3K9me2. En effet, la mutation du gène *KYP* induit une réduction des méthylations histone H3K9me1-H3K9me2 et ADN aux positions CNG; la méthylation H3K9me3 n'est en revanche pas affectée (Jackson et al., 2004). Le mécanisme qui permet à la méthylation H3K9me2 de contrôler la méthylation CNG n'est pas clairement décrit, mais pourrait impliquer le recrutement direct de CMT3 sur les histones méthylées grâce à l'intervention du chromodomaine de CMT3 (Lindroth et al., 2004). *In vitro*, la fixation de CMT3 aux histones *via* le chromodomaine nécessite la présence simultanée des méthylations H3K9 et H3K27, suggérant donc également une implication de la méthylation H3K27 dans le recrutement de CMT3 (Lindroth et al., 2004). Inversement, *in vitro*, KYP semble en mesure d'être recrutée par la méthylation CNG via son domaine SRA, ce qui indique que KYP pourrait être recrutée directement sur l'ADN méthylé *in vivo* (Johnson et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une boucle de renforcement entre les activités de KYP et de CMT3 permettant ainsi la maintenance efficace des méthylations H3K9 et CNG. Le lien méthylation ADN-histone n'est cependant pas systématique, par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, la distribution des méthylations H3K27me1 et H3K27me2 est indépendante de la méthylation ADN (Mathieu et al., 2005) (Tableau 1).

Chapitre 3 :

Régulation de l’expression génique par les ARN

1.Le phénomène de RdDM ou la méthylation ADN dirigée par les ARN

Chez les eucaryotes, et notamment *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, les mammifères ou les plantes, des petits ARN générés par le phénomène d'interférence ARN (RNAi) peuvent guider de manière spécifique les modifications épigénétiques entraînant la répression génique à de nombreux loci. Cette spécificité est basée sur l'homologie de séquence existant entre un petit ARN donné et le locus à cibler. La méthylation ADN dirigée par des ARN ou RdDM (« RNA directed DNA Methylation ») a été découverte chez les plantes par Wassenegger et al. (Wassenegger et al., 1994) durant leurs travaux sur les viroïdes infectant le tabac. Les viroïdes sont des pathogènes des plantes constitués uniquement d'un ARN circulaire non codant de quelques centaines de paires de bases. L'étude a été réalisée en intégrant des viroïdes transgéniques dans le génome du tabac puis en infectant ces plants par des viroïdes autonomes. Lors de la réplication de l'ARN des viroïdes, Wassenegger et al. ont observé la mise en place de méthylation sur l'ADN des viroïdes transgéniques. Ces résultats indiquent que l'ARN issu du processus de réplication du viroïde est en mesure d'induire la méthylation *de novo* des séquences ADN homologues. Cette découverte constitua le premier exemple de modification épigénétique induite par une composante ARN et renforça par là même un concept prévalant à l'époque. En effet, l'initiation de la répression génique était supposée reposer sur des homologies ADN-ADN, ADN-ARN ou ARN-ARN. Plus tard, il est apparu que la RdDM nécessitait l'intervention de petits ARN provenant d'ARN double brins (ARNdb) plus grands (Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001).

Chez les plantes, une marque caractéristique de la RdDM est la présence de méthylation ADN sur des cytosines situées en tous contextes, que ce soit en CG, CNG ou CNN (n pouvant être une base A, T ou C) (Pelissier et al., 1999). Il est important de noter qu'il existe une différence dans la transmission de la méthylation durant la mitose selon le contexte où se trouvent les cytosines. Les méthylations symétriques, CG et CNG, peuvent être copiées sur le brin ADN néosynthétisé en absence d'ARN inducteur. Ceci est assuré par les ADN méthyltransférases de maintenance MET1 (METHYLTRANSFERASE1) pour les sites CG (Finnegan et al.,

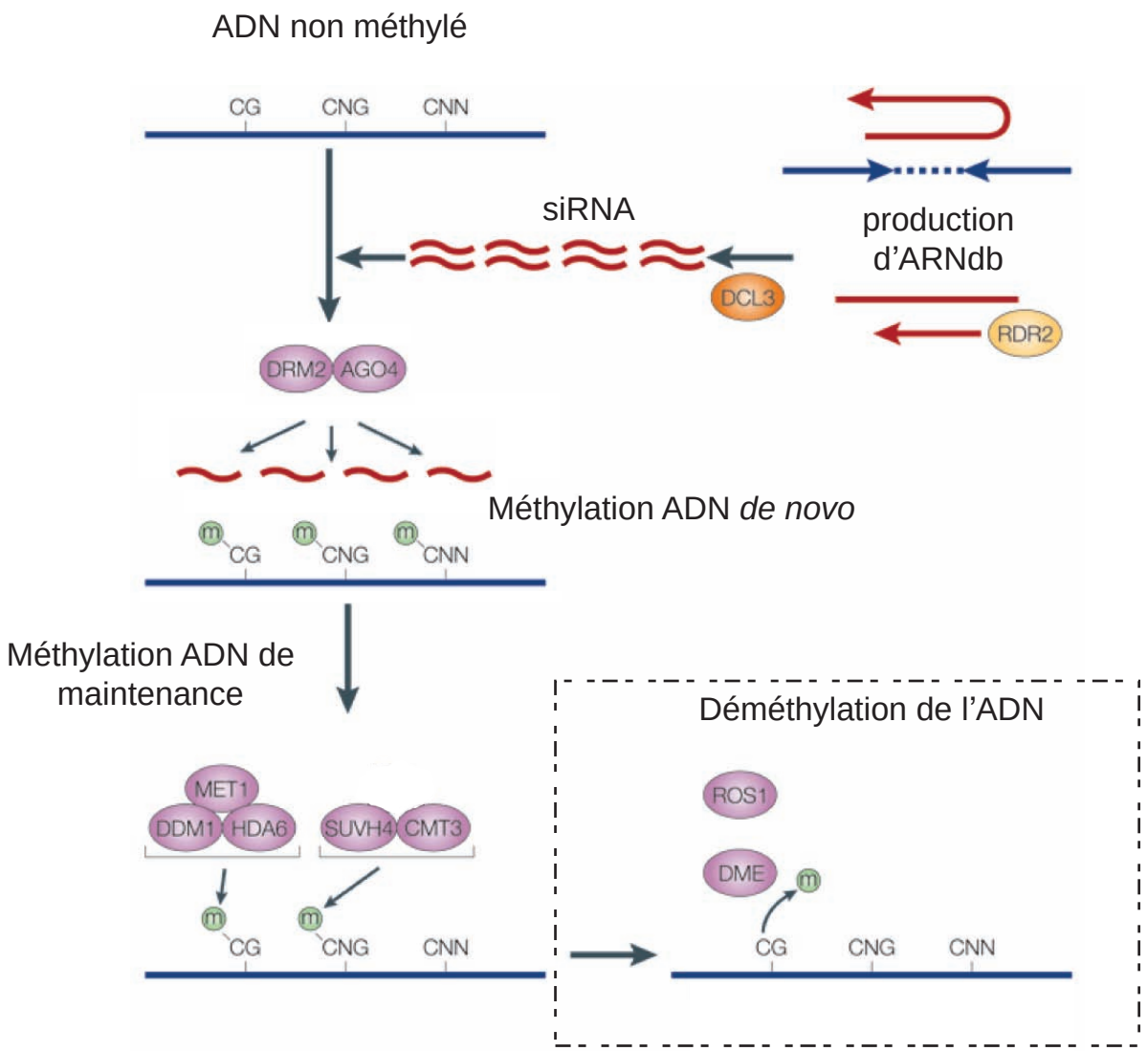


Figure 11: Mécanisme général de la méthylation de l'ADN dépendante des ARN (RdDM). Dans le noyau, des ARNdb peuvent être produits par RDR2 ou par transcription de répétitions inverses. Les ARNdb sont ensuite découpés en siRNA de 24 nt par l'enzyme à activité DICER DCL3. Les siRNA fixés par AGO4 permettent de guider DRM2 vers la séquence à méthyler.
Les méthylations CG et CNG peuvent ensuite être maintenues par les actions respectives de MET1 et CMT3. Le maintien de la méthylation des sites CG nécessite également la participation de l'histone déacétylase HDA6 et de la protéine de remodelage de la chromatine DDM1. La maintenance de la méthylation par CMT3 est accompagnée de la méthylation des histones en position H3K9 déposée par SUVH4/KYP. Les ADN glycosylases DME et ROS1 sont en charge de la déméthylation de l'ADN.
Ce schéma, simplifié, du mécanisme de RdDM ne tient pas compte notamment des actions de Pol IVa, Pol IVb, DRD1, DML2 et ROS3. D'après Matzke et Birchler (2005).

1996) et CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) pour les sites CNG (Bartee et al., 2001). Contrairement à la méthylation CG et CNG, la méthylation CNN n'est pas maintenue au cours des divisions cellulaires et requiert la présence d'une composante ARN pour rétablir le patron de méthylation asymétrique *de novo* sur l'ADN néosynthétisé à chaque cycle de réplication (Jones et al., 2001; Aufsatz et al., 2002a). De ce point de vue, la méthylation CNN peut-être considérée comme un évènement continu tant qu'une composante ARN est présente. La méthylation CNN est de ce fait réversible puisqu'elle est perdue à la première division en l'absence d'ARN inducteur.

Une seconde voie, qui est à distinguer de la RdDM spécifique des plantes, est la formation d'hétérochromatine guidée par les petits ARN. Ce processus, initialement décrit chez *Schizosaccharomyces pombe*, fait intervenir les composants de la machinerie RNAi (petits ARN, protéines Dicer, Argonaute et ARN polymérase ARN dépendante dans certains organismes) pour empaqueter les répétitions péricentromériques en tandem dans l'hétérochromatine constitutive (Grewal et Jia, 2007). *Schizosaccharomyces pombe* ne possèdant pas de système de méthylation ADN, ce processus passe donc en grande partie par de la méthylation histone. Chez cet organisme, le phénomène d'hétérochromatinisation dépendante des siRNA passe par une propagation de proche en proche des marques histones répressives à partir du point d'initiation par les petits ARN, et ce sur plusieurs centaines de paires de bases (Grewal et Jia, 2007).

1.1.Les composants de la RdDM chez *Arabidopsis thaliana*

La RdDM permet le « silencing » transcriptionnel et l'hétérochromatinisation de séquences grâce à la mise en place de méthylation ADN et la méthylation/déacétylation des histones guidées par des petits ARN. De fait, elle nécessite l'intervention d'ADN methyltransférases, d'histones méthylases et déacétylases ainsi que de protéines de la voie RNAi (Figure 11).

Trois protéines nucléaires appartenant à la voie RNAi sont utilisées par la cellule pour produire les petits ARN nécessaires au guidage de la RdDM (Xie et al., 2004). RDR2, l'une des six ARN polymérase ARN dépendante codées par le génome d'*Arabidopsis thaliana*, produirait les ARN double brins (ARNdb) indispensables à la RdDM à partir d'ARN simple brin. Le découpage des ARNdb en petits ARN de 24 nucléotides fait intervenir une des protéines à activité DICER-LIKE (DCL). Il existe

quatre protéines DCL chez *Arabidopsis*, la synthèse des siRNA de 24 nt (dits hétérochromatiques) intervenant dans la RdDM sont obtenus par l'action de DCL3. Enfin, la protéine AGO4 (parmi les dix protéines Argonaute codées par le génome d'*Arabidopsis thaliana*) semble prendre en charge les siRNA produits par DCL3. En effet, des travaux récents ont démontré qu'AGO4 est capable de lier des petits ARN provenant de transposons et autres séquences répétées (Qi et al., 2006; Xie et al., 2004), cependant AGO4 semble pouvoir agir de deux façons distinctes. A certains loci, AGO4 utilise son activité catalytique pour cliver des ARN ciblés et de ce fait produire une seconde vague de petits ARN qui vont venir renforcer le silencing. Dans d'autres cas, AGO4 participe, au sein du complexe RISC, au recrutement des acteurs de la méthylation ADN indépendamment de son activité catalytique.

Bien que les protéines de la voie RNAi (RDR, AGO et DCL) soient requises pour la RdDM, dans certains cas l'un ou l'autre des ces partenaires peut être remplacé voire absent. Par exemple, lorsque que les ARNdb sont générés par la transcription de séquences répétées en orientation inverse RDR2 ne semble plus indispensable (Lu et al., 2006). A certains loci AGO4 pourrait être substituée par (ou agir en partenariat avec) une autre protéine de la famille AGO (AGO6, AGO8 ou AGO9). Une étude récente a d'ailleurs permis de mettre en avant l'implication d'AGO6 dans le « silencing » transcriptionnel (Zheng et al., 2007). Il semblerait également que les fonctions DCL puissent être en partie redondantes puisque la disparition des siRNA 24 nucléotides dans un mutant *dcl3* laisse apparaître des siRNA de 21-22nt produits par DCL4 et DCL2. Cependant l'impact de ces siRNA sur les modifications de la chromatine est inconnu (Kasschau et al., 2007).

La principale ADN méthyltransférase en charge de la méthylation *de novo* est DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) (Cao et al., 2003) ; son homologue, DRM1, très faiblement exprimée, semble jouer un rôle négligeable dans ce processus (Cao et Jacobsen, 2002b). Une protéine homologue de DRM2, la méthyltransférase Dnmt3, est retrouvée chez les mammifères, cependant l'organisation des différents domaines protéiques n'est pas conservée. Il est probable que ce soit cette organisation particulière qui confère à DRM2 la capacité de méthyler les cytosines en tous contextes chez les plantes (Cao et al., 2000), Dnmt3 étant principalement dédiée à la méthylation CG chez les mammifères.

Deux protéines impliquées dans la modification des marques histones agissent dans la voie RdDM, il s'agit de HDA6 et KYP (KRYPTONITE aussi connue sous le

nom SUVH4). HDA6 est une histone déacétylase qui vient renforcer la méthylation induite par une composante ARN (Aufsatz et al., 2002b; Probst et al., 2004). KYP quant à elle est une histone méthyltransférase H3K9 indirectement impliquée dans la maintenance de la méthylation ADN notamment aux positions CNG (Jackson et al., 2002). Deux autres histone méthyltransférases, SUVH5 et SUVH6, participent indirectement à la maintenance de la méthylation ADN aux positions CNG et CNN de certains loci (Ebbs et al., 2005; Ebbs et Bender, 2006).

Enfin, des travaux récents ont pu mettre en évidence des partenaires essentiels de la RdDM : l'ARN polymérase IV, sous ses formes Pol IVa et Pol IVb, et DRD1 (« Defective in RNA-directed DNA methylation 1 ») appartenant à la famille des protéines de remodelage de la chromatine SWI-SNF2.

1.2.Les petits ARN hétérochromatiques chez les plantes

La découverte que les petits ARN étaient capables d'inactiver des gènes durant le développement ou d'empêcher les évènements d'invasion du génome par des virus ou des éléments transposables a profondément changé l'idée que l'on se faisait de la régulation génique. La quantité et la diversité des petits ARN trouvés chez ces organismes suggèrent que ce type de régulation n'est pas ponctuel mais au contraire largement utilisé par la cellule pour gérer les modifications épigénétiques.

Des expériences de séquences à grande échelle ont permis de mettre en évidence approximativement 340 000 petits ARN différents chez *Arabidopsis thaliana*. Plus de la moitié d'entre eux se sont révélés être des siRNA 24nt provenant essentiellement de transposons, de séquences répétées ou de séquences intergéniques en contextes hétérochromatiques (Henderson et al., 2006; Kasschau et al., 2007; Mosher et al., 2008; Rajagopalan et al., 2006). Tous ces siRNA peuvent potentiellement diriger la méthylation ADN et/ou histone vers leurs cibles génomiques. La synthèse de la grande majorité de ces siRNA nécessite l'action de Pol IVa, RDR2 et DCL3 (Kasschau et al., 2007; Zhang et al., 2007).

La biosynthèse des siRNA nécessite une étape supplémentaire indispensable à leur stabilité. Après la catalyse réalisée par DCL3, les siRNA doivent subir une méthylation en position 2'OH du ribose terminal-3' qui est réalisée par la petite ARN méthyltransférase HEN1 (HUA ENHANCER1). Le mutant *hen1* présentant une hétérogénéité dans la taille des siRNA, il est proposé que la 2'-*O*-méthylation protège

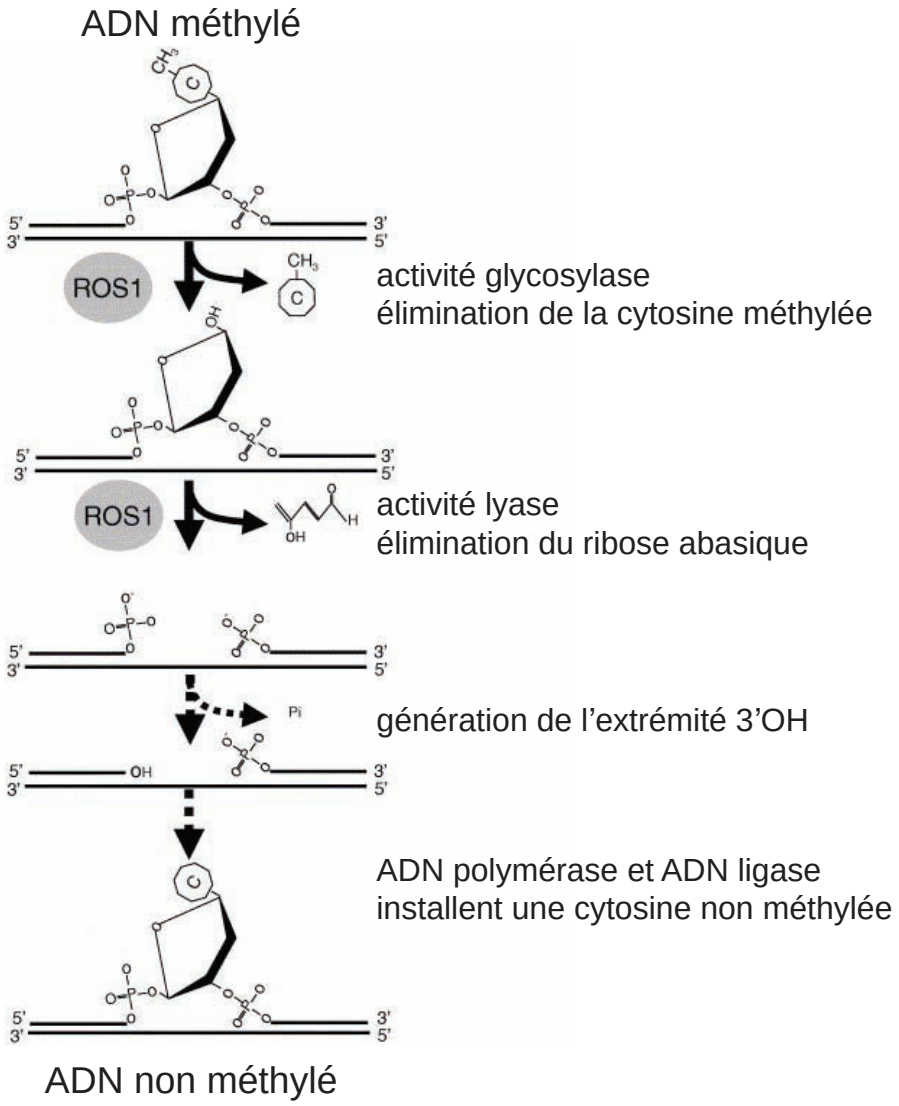


Figure 12: Modèle de déméthylation de l'ADN par ROS1. Grâce à son activité glycosylase, ROS1 enlève la cytosine méthylée. Le ribose abasique formé est éliminé par l'activité lyase de ROS1. Puis, l'extrémité 3'OH pourrait être générée par l'action d'une endonucléase. Une nouvelle cytosine, non méthylée, pourrait être installée par les actions concertées d'une ADN polymérase et d'une ADN ligase. D'après Kapoor et al. (2005)

les siRNA d'une oligo-uridylation et donc d'une dégradation prématurée (Yang et al., 2006). Il est probable que dans un futur proche d'autres rôles soient attribués à cette 2'-*O*-méthylation. Compte tenu du fait que cette méthylation est capable d'affecter les interactions siRNA – protéines, *a priori*, tous les mécanismes faisant intervenir les siRNA pourraient être affectés par la présence/absence de cette modification.

1.3.La déméthylation de l'ADN

A la différence de la méthylation ADN où une foule d'informations ont été recueillies au fil des années, le mécanisme de déméthylation est peu connu. La déméthylation de l'ADN est passive quand elle est due à une inhibition ou à un défaut de la méthylation de maintenance, elle est donc progressivement perdue au cours des cycles cellulaires. Les mécanismes actifs de déméthylation supposent l'intervention d'activités enzymatiques qui sont assurées par quatre protéines chez *Arabidopsis thaliana* : DME (DEMETER), DML2 et DML3 (DEMETER-LIKE), ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING). Pour retirer la méthylation des cytosines, DME, DML3 et ROS1 utilisent leurs fonctions glycosylase/lyase, le mode d'action de DML2 étant encore incertain. Dans un premier temps, L'ADN glycosylase enlève de manière spécifique la 5-methylcytosine en cassant la liaison N-glycosidique puis l'activité lyase coupe l'ADN libérant ainsi le ribose abasique. Le reste du processus pourrait utiliser des partenaires du système de réparation de l'ADN par excision de base (« base excision DNA repair ») comme une endonucléase générant une extrémité 3'OH permettant ainsi à une ADN polymérase de réparation et une ligase de placer une cytosine non méthylée (Figure 12) (Agius et al., 2006; Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Kapoor et al., 2005; Morales-Ruiz et al., 2006; Penterman et al., 2007).

1.3.1.DEMETER et DEMETER-LIKE

DEMETER (DME) a été identifiée lors d'un crible visant à isoler des mutations entraînant des effets d'origine parentale sur la viabilité des graines (Choi et al., 2002). DME s'est révélée être nécessaire à l'expression de l'allèle maternel *MEDEA* (*MEA*). Initialement, l'expression de *DME* était considérée comme restreinte à la cellule centrale du gamétophyte femelle, précurseur de l'endosperme où sont instaurées les empreintes parentales qui régulent le développement de la graine. Il a été démontré que la méthylation ADN jouait un rôle primordial dans le contrôle de l'empreinte du gène MEA ainsi que dans la viabilité des graines. Il a également été montré que la mise en place correcte de la méthylation lors de ces processus résulte de l'antagonisme fonctionnel existant entre MET1 et DME (Xiao et al., 2003). Enfin, il semblerait que DME puisse avoir d'autres rôles que ceux associés aux empreintes parentales comme le suggère la récente détection de transcrits *DME* dans des feuilles de plantes adultes (Mathieu et al., 2007).

A la différence de DME, DML2 et DML3 sont présentes dans quasiment tous les organes de la plante avec cependant une plus forte concentration dans la fleur. DML3 possède une activité glycosylase/lyase identique à celle de DME, ce qui n'a pas pu être clairement démontré pour DML2 même si celle-ci possède un rôle indéniable dans la déméthylation. De façon intéressante,certains loci normalement méthylés en contexte sauvage sont déméthylés dans les mutants *dml2* et *dml3*, ceci étant a priori contradictoire avec le rôle de déméthylation associé aux protéines DEMETER-LIKE. Il semble donc que, en plus de leur activité de déméthylation, DML2 et DML3 aient un impact sur le positionnement de la méthylation ou directement sur la mise en place de cette méthylation (Ortega-Galisteo et al., 2008).

1.3.2.REPRESSOR OF SILENCING 1

La protéine glycosylase/lyase ROS1 a été identifiée dans un crible visant à isoler des mutants ayant une expression dérégulée du transgène *LUCIFERASE* placé sous le contrôle du promoteur du gène *RD29A* (transgène *RD29A::LUC*). La mutation *ros1* entraîne le « silencing » de ce transgène et du gène endogène *RD29A*, en induisant l'hyperméthylation des promoteurs *RD29A* (transgénique et endogène). Le « silencing » du transgène est levé par la mutation *ddm1* ou l'utilisation de la 5-aza-

cytidine, un inhibiteur de la méthylation des cytosines (Agius et al., 2006; Gong et al., 2002).

ROS1 semble entretenir des liens particuliers avec les partenaires de la voie RdDM. En effet, l'expression de *ROS1* est réduite dans les mutants *pol IV*, *rdr2*, *drd1* (Huettel et al., 2006) et *drm2* (Penterman et al., 2007). Cette dérégulation apparaît spécifique de la voie PolIV/RDR2/DCL3/AGO4 puisque la mutation du gène *RDR6*, également impliquée dans la voie des petits ARN, n'entraîne aucune variation de l'expression de *ROS1*. Ces résultats suggérent donc l'existence d'une relation étroite entre l'expression de *ROS1* et la voie PolIV/RDR2/DCL3/AGO4/DRM2 (décrite ultérieurement) dans sa globalité plutôt qu'avec l'un de ses acteurs en particulier. De plus, l'activité même de ROS1 semble intimement liée à la voie PolIV/RDR2/DCL3/AGO4/DRM2. D'une part, dans les mutants *drm2* et *rdr2*, les loci normalement déméthylés par ROS1 accumulent de la méthylation aux positions CG. D'autre part, des allèles hyperméthylés hérités sont déméthylés par ROS1 dans la génération suivante si elle possède les copies sauvages de *RDR2* mais restent hyperméthylées en condition *rdr2* (Penterman et al., 2007).

Ce phénomène pourrait être en partie expliqué par la récente caractérisation de ROS3 (Zheng et al., 2008). Mise en évidence avec le même système transgénique *RD29A::LUC* utilisé pour l'identification de ROS1, ROS3 semble en outre agir dans la même voie que ROS1. La capacité de ROS3 à lier de petits ARN *in vitro* comme *in vivo* suggère que ROS3 pourrait guider la déméthylation assurée par ROS1 *via* l'utilisation de petits ARN. Cependant, ROS3 pourrait également inhiber la mise en place de la méthylation dépendante des ARN en séquestrant les siRNA guidant cette méthylation (Zheng et al., 2008). La fonction exacte de ROS3 reste donc à caractériser.

2.L'ARN polymérase IV

2.1.Identification de l'ARN polymérase IV

Chez les eucaryotes, trois ARN polymérase ADN dépendante permettent la transcription de l'ADN en ARN. L'ARN polymérase I transcrit les gènes d'ARN ribosomiques (Grummt, 2003); l'ARN polymérase II transcrit la majorité des gènes et notamment ceux codant pour des protéines (Woychik et Hampsey, 2002). Enfin, l'ARN polymérase III est en charge de la transcription d'ARN fonctionnels comme les ARNt ou les ARNr 5S (Schramm et Hernandez, 2002).

Une des caractéristiques de l'ARN polymérase II est l'existence d'un motif répété, essentiel à la survie cellulaire, trouvé dans l'extrémité C-terminale de la grosse sous-unité RPB1 (motif CTD) (Corden, 1990) et pouvant subir des cycles de phosphorylation/déphoshorylation (Carlson, 1997; Dahmus, 1996; Greenblatt, 1997). Il a été montré qu'en vertu de l'état de phosphorylation de ce motif CTD, l'ARN polymérase II peut recruter des protéines lui permettant de réguler de nombreuses étapes de la transcription, allant de l'initiation à la terminaison (Greenblatt, 1997; Kim et al., 2004; Otero et al., 1999) en passant par le recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Hampsey et Reinberg, 2003), ou encore dans la maturation des ARN pré-messagers (Bentley, 1999; Hirose et Manley, 2000). De fait et compte tenu du rôle central de l'ARN polymérase II, il apparaît évident que le motif CTD est essentiel à la survie cellulaire.

En 2005, l'analyse des séquences disponibles pour le génome d'*Arabidopsis thaliana* (AGI, 2000) a permis au groupe de C. Pikaard d'identifier quatre sous-unités protéiques appartenant à une nouvelle classe d'ARN polymérase (Onodera et al., 2005). En effet, l'étude phylogénétique réalisée indique que ces 4 sous-unités forment des groupes distincts des ARN polymérase I, II et III, des ARN polymérases mitochondriales et chloroplastiques, et des ARN polymérases ARN dépendantes. Cette nouvelle classe a été désignée ARN polymérase IV.

L'ARN polymérase IV (pol IV) peut être retrouvée dans le noyau sous deux formes, Pol IVa et Pol IVb, toutes deux ayant en commun la sous-unité NRPD2a (« Nuclear RNA Polymerase D2a ») (Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005). La différence entre ces deux formes se fait donc sur l'association de NRPD2a avec l'une

des grandes sous-unités NRPD1a ou NRPD1b, formant respectivement les ARN polymérase IVa et IVb (Pontier et al., 2005). L'analyse des séquences d'*Arabidopsis* révèle que le gène *NRPD2b* codant pour une putative quatrième sous-unité semblerait dans l'incapacité de produire une protéine fonctionnelle puisqu'il présente un codon stop dans le premier exon.

NRPD1a et NRPD1b possèdent des structures équivalentes avec notamment la présence d'un domaine C-terminal CTD. Cependant, le CTD de NRPD1b contient une répétition hydrophile riche en glycine et tryptophane (répétitions WG-GW) (El-Shami et al., 2007; Li et al., 2006) absente de NRPD1a. NRPD1a et NRPD1b présentent également un motif DCL (« Defective Chloroplasts and Leaves ») dont la fonction au sein de l'ARN polymérase IV n'a pas été caractérisée mais qui pourrait éventuellement être impliqué dans des interactions avec les ARN.

2.2.L'ARN polymérase IV et le « silencing » transcriptionnel via les siRNA.

Chez *Arabidopsis thaliana*, Dalmay et al. avaient identifié le mutant *sde4* (« silencing defective 4 ») induisant une perte transitoire de « silencing » de transgènes GFP (Dalmay et al., 2000). Par la suite, il a été montré que la mutation *sde4* induit une diminution des méthylations ADN aux positions CNN et CNG de différentes cibles, et empêche l'établissement, mais pas la maintenance, de la méthylation CG (Chan et al., 2004). SDE4 correspond en réalité à la grande sous-unité NRPD1a de l'ARN polymérase IV (Herr et al., 2005). Une fois l'ARN polymérase IV caractérisée, ces défauts dans l'établissement des patrons de méthylation CNN et CNG ont été confirmés et étendus à d'autres cibles dans quatre études parues entre 2005 et 2006. En effet, les gènes d'ARNr 5S, les transposons AtSN1, les séquences LTR (« Long Terminal Repeat ») ou bien encore les répétitions SINE présentes autour du promoteur du gène FWA, sont fortement déméthylés dans les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b* et/ou *nrpd2a* (Herr et al., 2005; Huettel et al., 2006; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005). La dérépression de la plupart des séquences montrant une forte déméthylation a également été rapportée, à commencer par le gène FWA dont l'expression ectopique provoque un retard dans la floraison. En effet, Pontier et al. ont rapporté que la déméthylation des SINE se

trouvant en amont du gène FWA induit leur expression mais également celle du gène FWA (Pontier et al., 2005). De la même façon, en contexte *nrpd1a*, le groupe de D. Baulcombe a observé la dérépression d'éléments transposables AtSN1 et d'un transgène GFP (réprimé en contexte sauvage) (Herr et al., 2005).

La réactivation des cibles mentionnées ci-dessus est accompagnée dans tous les cas par une diminution significative ou une complète disparition des siRNA correspondants dans les mutants *nrpd1a*, *nrpd2a* et de manière moins systématique dans le mutant *nrpd1b*. En effet, les siRNA AtSN1 et FWA disparaissent dans les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b*, *nrpd2a* ou le double mutant *nrpd1a-nrpd1b* (Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005) ; ceux dirigés contre le transgène GFP sont réduits dans le mutant *nrpd1a* (les données en contexte *nrpd1b* et *nrpd2a* ne sont pas disponibles). Huettel et al. rapportent une disparition des siRNA LTR dans *nrpd1a* et *nrpd2a* mais ils restent présents dans *nrpd1b*. Quant aux siRNA dirigés contre l'espaceur intergénique des gènes d'ARNr 5S, la situation est moins évidente puisque certains rapportent leur disparition complète dans les mutants *nrpd1a* et *nrpd2a* (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005) alors que d'autres ne voient qu'une diminution dans les trois mutants (Pontier et al., 2005). Ces résultats mettent en évidence le rôle des ARN polymérase IVa et IVb dans la biogenèse des siRNA mais suggèrent également des implications différentes selon les séquences ciblées.

Au niveau chromatinien, il apparaît que l'ARN polymérase IV est impliquée dans la condensation des gènes d'ARNr 5S et dans la mise en place (ou la localisation adéquate) de la méthylation des histones en H3K9me2 et H3K27me1 (Huettel et al., 2006; Onodera et al., 2005).

Au vu de ces résultats, il apparaît évident que l'ARN polymérase IV a un rôle important dans le « silencing » des transposons et des séquences répétées. Pourtant, et de manière étonnante, les répétitions centromériques ne semblent pas sous l'influence de cette polymérase : ni déméthylation ni décondensation n'ont été observées dans les mutants. Onodera et al. (2005) ont donc proposé que l'ARN polymérase IV aurait pour cible des gènes dont l'état oscille entre des états euchromatique et hétérochromatique.

Ces quatre premières études ont permis de poser les bases des recherches autour de l'ARN polymérase IV. Ceci a surtout permis d'ouvrir des pistes pour la résolution d'un paradoxe existant à l'époque : comment un « silencing » transcriptionnel impliquant les ARN peut être maintenu alors que par définition les

sites réprimés sont censés ne pas produire d'ARN ? (Vaughn et Martienssen, 2005). A ce jour, la matrice utilisée par l'ARN polymérase IV n'est toujours pas connue, mais son mécanisme d'action est mieux compris, notamment en ce qui concerne les rôles distincts qu'ont à jouer les formes Pol IVa et IVb.

2.3.La forme ARN polymérase IVa

2.3.1.NRPD1a : caractérisation et modes d'action proposés

Les premières études citées plus haut (Herr et al., 2005; Huettel et al., 2006; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005), bien que basées sur un petit nombre de loci, ont permis de mettre en avant une réelle implication de l'ARN polymérase IV dans la voie RdDM. Ce fait a été entériné par une étude récente montrant que 94% des 4600 loci chez *Arabidopsis thaliana* produisant des petits ARN le font de manière dépendante de Pol IVa (Mosher et al., 2008). Ces petits ARN regroupent des micro ARN (miRNA) et des siRNA majoritairement de 24nt. Une étude de Kanno et al. (2005) montre des comportements différents de Pol IVa et Pol IVb en termes de fonction et d'entrée en action dans la voie RdDM : Pol IVa semble agir en amont de la synthèse des siRNA alors que Pol IVb agirait tardivement dans le processus de RdDM. Il a donc été proposé que Pol IVa permettrait de fournir le substrat nécessaire à la production de siRNA, à savoir des transcrits simple brin issus de régions péricentromériques ou d'autres séquences hétérochromatiques. A l'appui de cette hypothèse, des expériences d'immunolocalisation ont montré que Pol IVa colocalise avec des loci dont sont issus un grand nombre de siRNA 24nt (connus pour guider les modifications chromatiniennes) et, en condition *nrpd1a*, des composantes de la voie RdDM telles que RDR2, DCL3 ou NRPD1b sont délocalisées. La fonction de Pol IVa se trouverait donc dans les étapes initiales du processus RdDM, sans doute avant l'entrée de RDR2 (Pontes et al., 2006).

Les premiers modèles impliquant l'ARN polymérase IV dans le processus RdDM suggéraient une transcription directe d'ADN méthylés (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005) ou une transcription d'ARN à partir d'une matrice ARN par la Pol IVa (Huettel et al., 2006). Les transcrits ainsi obtenus seraient ensuite dirigés vers RDR2 pour être amplifiés et transformés en ARNdb. Cependant, Pontes

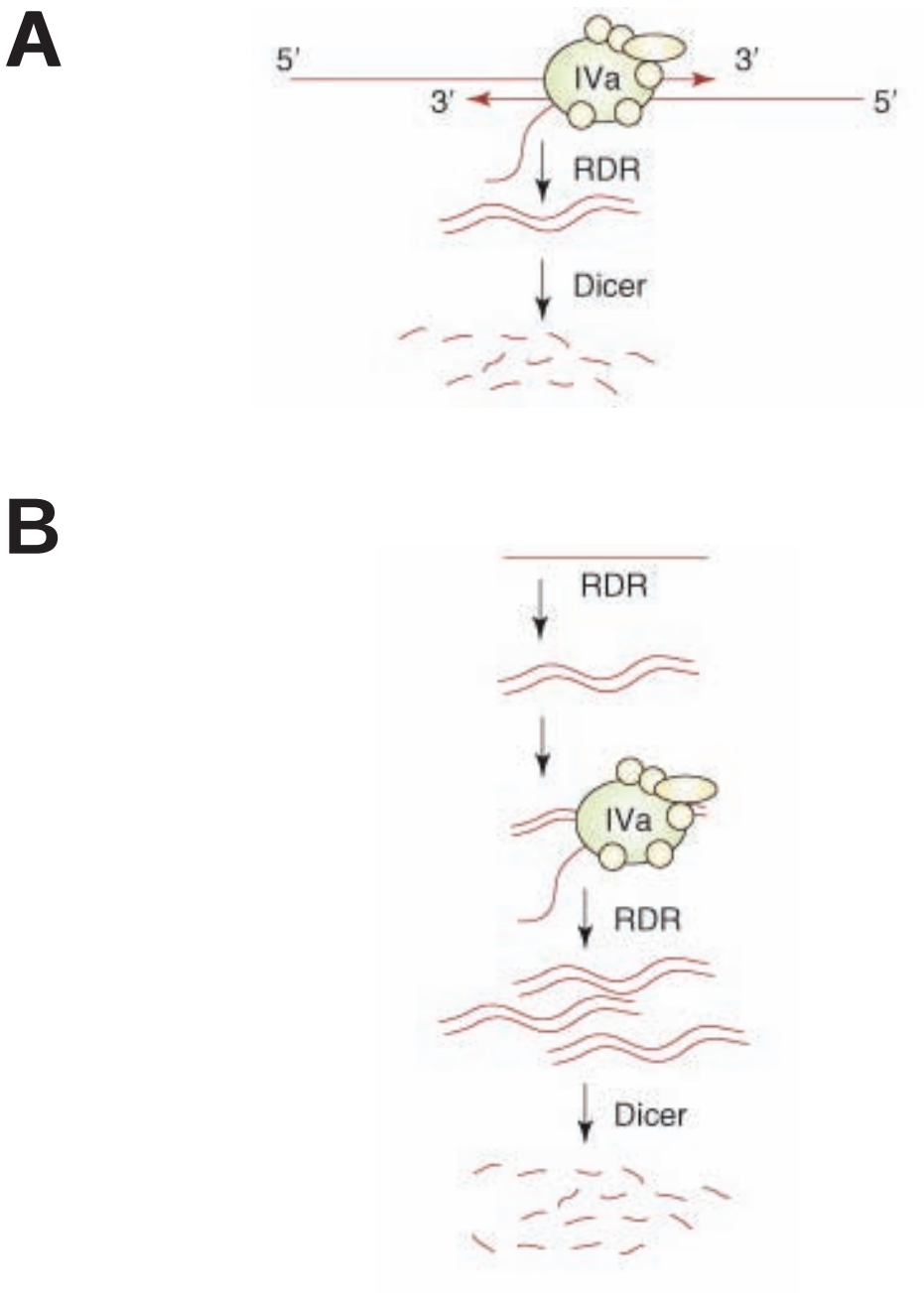


Figure 13: Deux modèles impliquant l'ARN polymérase IVa sur des matrices ARNdb. (A) Un ARNdb formé par l'appariement de deux transcrits en orientation inverse servirait de matrice à l'ARN polymérase IVa. L'ARN produit serait pris en charge par une RDR pour former de nouveaux ARNdb qui seraient ensuite transformés en siRNA par une protéine à activité Dicer. **(B)** Un ARNdb créé par l'action d'une RDR servirait de matrice à l'ARN polymérase IVa. Le transcrit ainsi généré serait transformé en ARNdb par une RDR puis en siRNA par une protéine à activité Dicer. D'après Pikaard (2008).

et al. (2006) ont rapporté que Pol IVa est délocalisée lorsque, *in vitro*, les noyaux sont mis en présence de RNAse. En revanche et à la différence de l'ARN polymérase II, lors d'un traitement DNAse la localisation de Pol IVa est maintenue. Il apparaît donc plus probable que Pol IVa utilise une matrice ARN. Il ne s'agirait pas d'un cas unique chez les ARN polymérases ADN dépendantes puisque, par exemple, les génomes ARN du Delta Virus Hépathique et des viroïdes de plantes sont répliqués par l'ARN polymérase II (Ding et Itaya, 2007; Greco-Stewart et al., 2007). Ceci suggère que les ARN polymérases ADN dépendantes sont capables, dans une certaine mesure, d'utiliser une matrice ARN.

De manière alternative, C. Pikaard (Pikaard et al., 2008) (Figure 13) propose deux modèles dans lesquels Pol IVa occupe des places différentes au sein de la voie RdDM : avant et après les protéines RDR. Dans le premier cas, Pol IVa utiliserait comme matrice des ARNdb formés à partir de l'appariement de transcrits simple brin (sens et antisens) pour générer un transcrit utilisable par RDR2. Ici, l'action de Pol IVa serait antérieure à celle des RDR. Dans le second cas, Pol IVa se trouverait en aval d'une première action réalisée par une des protéines du groupe RDR. Des transcrits sens et antisens, appariés sur une partie de leurs séquences respectives, déclencheraient la production de petits ARN correspondant à l'appariement, et ce en faisant intervenir les protéines DICER. Les petits ARN ainsi produits permettraient la reconnaissance de l'un et/ou l'autre des transcrits initiaux et permettraient de le(s) diriger vers les protéines RDR pour subir une transformation en ARNdb. Puis Pol IVa utiliserait les ARNdb nouvellement synthétisés comme matrice pour fournir des transcrits au processus de RdDM. Ce système permettrait, à partir d'un appariement initial de faible longueur, de générer des siRNA complémentaires au transcrit initial sur toute sa longueur, et donc d'induire un silencing transcriptionnel plus efficace (Figure 13).

2.3.2.RDR2 et CLSY : partenaires privilégiés de Pol IVa

RDR2 code pour une ARN polymérase ARN dépendante qui est requise pour la synthèse de siRNA endogènes (Xie et al., 2004). La synthèse de siRNA doit passer par la génération d'ARNdb et il paraît peu probable que Pol IV a soit en mesure de les produire. De ce fait, RDR2 semble être le candidat idéal pour la synthèse des ARNdb à partir des transcrits qui seraient produits par Pol IVa. Ceci est appuyé par

des expériences de séquençage à grande échelle montrant que les mutations *nrpd1a* et *rdr2* ont des conséquences similaires sur la synthèse des siRNA 24nt (la plupart des loci produisant ces siRNA 24nt étant sous le contrôle de Pol IVa et RDR2) (Kasschau et al., 2007; Zhang et al., 2007). De la même manière, des expériences d'immunolocalisation montrent, en condition *nrpd1a*, la perte de localisation des autres composants de la voie RdDM, et notamment de RDR2.

Plus récemment, une expérience de mutagénèse à l'éthyl méthanesulfonate (EMS) a permis d'identifier CLASSY1 (CLSY1), une nouvelle protéine appartenant à la famille des SWI-SNF nécessaire à la synthèse de siRNA. L'étude microscopique indique que CLSY1 et RDR2 partagent une localisation nucléolaire, de plus la mutation *clsy1* entraîne la perte de localisation nucléolaire de RDR2. NRPD1a est également délocalisée dans le mutant *clsy1*. Il semblerait donc que CLSY1 serve d'interface entre Pol IVa et RDR2 facilitant ainsi la production d'ARNdb par RDR2 à partir des transcrits Pol IVa (Smith et al., 2007).

2.4.La forme ARN polymérase IVb

2.4.1.NRPD1b : caractérisation et mode d'action proposé

NRPD1b a été mise en évidence parallèlement par deux groupes (Kanno et al., 2005; Pontier et al., 2005). En cherchant des mutations induisant des défauts de méthylation, Kanno et al. (2004 ; 2005) ont identifié DRD1 (une protéine de type SWI-SNF spécifique des plantes), DRD2 (qui s'est révélée être NRPD2a) et DRD3 (qui est en fait NRPD1b). Pontier et al. (2005) en reprenant les données de séquences AGI (« Arabidopsis Genome Initiative », 2000) ont caractérisé la totalité des sous-unités ARN polymérases IV, et notamment NRPD1b.

Ce dernier groupe a pu prouver l'existence de la forme Pol IVb en réalisant des expériences de co-stabilisation avec la protéine NRPD2a. Il apparaît également que NRPD1b est plus abondante que NRPD1a et que NRPD2a s'associe principalement avec NRPD1b. Pris ensemble, les résultats obtenus nous indiquent que les formes Pol IVa et Pol IVb agissent de manières non redondantes pour la méthylation de l'ADN et pour la synthèse de siRNA sur différentes cibles (FWA, AtSN1, ADNr 5S). En effet, aucun effet additif n'a été observé sur la méthylation ADN lorsque les

expériences sont menées avec le double mutant *nrpd1a-nrpd1b*. Ces faits suggèrent donc que Pol IVa et PolIVb ont des rôles distincts : si les deux formes sont impliquées dans le phénomène de RdDM, Pol IVa semble en amont de la synthèse des siRNA et Pol IVb en aval.

Compte tenu du fait que Pol IVb paraît être en aval de la synthèse de siRNA et que le but de la voie RdDM est d'installer de la méthylation asymétrique afin d'instaurer le « silencing » d'un site cible, il a été proposé que Pol IVb dirige cette méthylation *via* les siRNA alors que Pol IVa contribue à leur production. Ceci est appuyé par la présence des répétitions hydrophiles potentiellement phosphorylables du domaine CTD de Pol IVb. En effet, le domaine CTD de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II, constitué d'un nombre variable de répétitions heptapeptidiques (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) selon les organismes, sert de plateforme entre autres pour le recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Hampsey et Reinberg, 2003). Il est d'ailleurs probable que le CTD de l'ARN polymérase II puisse recruter des enzymes intervenant dans la modification des marques épigénétiques. Par exemple, chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux résidus sérine de cette polymérase ont la capacité d'être phosphorylés permettant de ce fait le recrutement d'histone methyltransférases (Set1 et Set2) entraînant ainsi une méthylation d'histone caractéristique de la chromatine permissive à la transcription (Hampsey et Reinberg, 2003). De la même façon, mais dans les cellules humaines, de nombreuses protéines, dont des protéines de remodelage de la chromatine, sont proposées comme partenaires fonctionnels de l'ARN polymérase II *via* une association avec le domaine CTD (Carty et Greenleaf, 2002). Pour revenir à l'ARN polymérase IV, compte tenu de son implication dans le processus de RdDM il serait tentant d'imaginer une interaction entre le domaine CTD de NRPD1b et des ADN méthyltransférases, ou d'autres enzymes impliquées dans des modifications épigénétiques.

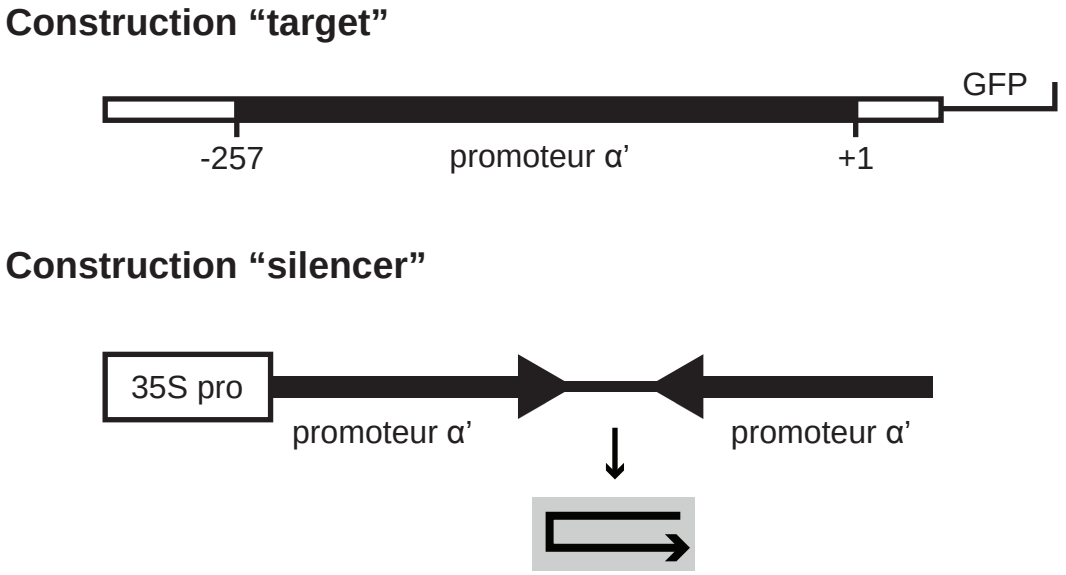


Figure 14: Les constructions “target” et “silencer” utilisées par le groupe de M. Matzke. La construction “target” est composée de 257 pb du promoteur α’ contrôlant l’expression d’un gène GFP. La construction “silencer” possède deux fragments du promoteur α’ en orientation inverse placés sous le contrôle d’un promoteur 35S (35S pro), produisant ainsi un ARNdb. D’après Kanno et al. (2005).

2.4.2.Les partenaires de NRPD1b : AGO4, DRM2 et DRD1

2.4.2.1.DRD1

Le crible réalisé par Kanno et al. (2004 ; 2005) a permis, comme vu précédemment, d'identifier simultanément DRD1, DRD2 et DRD3 (DRD2 et DRD3 étant, respectivement, NRPD2a et NRPD1b). Cette étude, fait intervenir deux constructions distinctes : d'un côté, une construction dite « target » composée entre autres d'une séquence enhancer virale et d'une séquence GFP sous promoteur minimum. De l'autre côté la construction dite « silencer » comporte la séquence de l'enhancer organisée en répétitions inverses et sous le contrôle d'un promoteur 35S, ceci permettant la synthèse d'un ARN double brin de type « hairpin » (Figure 14). Le mutant *drd1* présente une forte baisse de méthylation CNN de la construction « target » normalement réprimée en présence de la construction dite « silencer » mais pas des sites CG, ce qui suggère une implication de DRD1 dans la méthylation *de novo*. Cette hypothèse a été testée en réalisant des expériences permettant de clairement différencier méthylation de maintenance et *de novo.* Il apparaît que seule la méthylation CNN provoquée par la composante ARN issue de la construction « silencer » est perdue en condition *drd1*. DRD1 est donc nécessaire à la méthylation *de novo* ARN dépendante sur la construction ciblée. De manière surprenante, DRD1 est aussi impliquée dans l'effacement complet de la méthylation des sites CG de la construction « target » quand elle n'est plus en présence de la séquence « silencer ». DRD1 semble donc faciliter la régulation dynamique de la méthylation ADN *de novo*.

Le genome *d'Arabidopsis thaliana* possède une quarantaine de gènes codant pour des protéines de remodelage de la chromatine de type SWI-SNF2. DRD1 appartient à une sous-famille de protéines de type SWI-SNF2 spécifique des plantes comprenant au moins six membres. Une analyse bioinformatique a permis de rapprocher DRD1 du groupe de protéines « Rad54-like », qui en plus de contenir la protéine Rad54, comprend les sous-familles ATRX et JBP2 (Flaus et al., 2006). Chez l'Homme notamment, la mutation du gène *ATRX* (« α-thalassemia, mental retardation, X-linked ») entraîne de nombreuses modifications du patron de méthylation des séquences hétérochromatiques (Gibbons, 2006).

DDM1 (Decrease In DNA Methylation 1), une autre protéine de type SWI-SNF2, est également impliquée dans la régulation de la méthylation chez les plantes (Jeddeloh et al., 1999). DDM1 a un rôle dans la maintenance de la méthylation et notamment des sites CG alors que DRD1 semble dédiée à la méthylation *de novo* en tous contextes (CG, CNG ou CNN).

Le phénomène de dépendance de la RdDM vis-à-vis de DRD1 indique que ce processus nécessite un remaniement de la chromatine, cependant, le mécanisme d'action de DRD1 dans cette voie demeure inconnu. Aucune activité de remodelage de la chromatine ne lui a été attribuée, à la différence de DDM1 qui a la capacité de modifier le positionnement des histones *in vitro* (Brzeski et Jerzmanowski, 2003). Kanno et al. ont proposé que DRD1 puisse être impliquée dans le ciblage de séquences à méthyler en utilisant des homologies de séquences petits ARN-ADN, cependant, cette hypothèse reste à confirmer expérimentalement (Kanno et al., 2004).

2.4.2.2.ARGONAUTE (AGO4 et AGO6)

Les protéines ARGONAUTE sont impliquées dans de nombreuses régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles du fait de leur capacité à lier les petits ARN et à guider les mécanismes de régulation.

ARGONAUTE4 (AGO4) est une protéine nucléaire (Xie et al., 2004) qui, avec les autres composantes de la machinerie RNAi, participe à l'établissement de la méthylation de répétitions en tandem situées dans le promoteur d'un transgène codant pour FWA et conduisant à son « silencing » (Chan et al., 2004). Mais AGO4 a aussi un rôle dans la maintenance de la méthylation ADN et de la méthylation des histones (positions H3K9) de plusieurs répétitions endogènes et transgéniques ainsi que dans l'accumulation des siRNA correspondant à ces séquences (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003; Zilberman et al., 2004). Le fait que la mutation *ago4* affectait principalement la méthylation non-CG et la maintenance de siRNA endogènes suggèrait une implication de AGO4 dans la RdDM.

Concernant la participation de AGO4 dans une voie Pol IV, Li et al. (2006) ont pu mettre en évidence une interaction spécifique d'AGO4 avec le CTD (« C-Terminal Domain ») de NRPD1b. Comme vu précédemment le CTD de NRPD1b contient un motif particulier constitué de répétitions WG-GW qui sont absentes de NRPD1a. El-

Shami et al. (El-Shami et al., 2007) ont testé le rôle de ces répétitions propres à NRPD1b dans l'interaction spécifique avec AGO4. Il apparaît que cette séquence est nécessaire et suffisante à la liaison d'AGO4. En effet, l'introduction du gène *NRPD1b* dans un mutant *nrpd1b* restaure le patron de méthylation qui avait été perdu. En revanche, si l'on introduit une copie *NRPD1b* dont les répétitions WG-GW ont été retirées, la méthylation n'est pas récupérée. Le motif WG-GW de NRPD1b permet donc de recruter AGO4, ces deux protéines étant nécessaires pour les dernières étapes de la RdDM.

Le recrutement de protéine AGO par un motif de type GW n'est pas un cas unique. Par exemple, la sous-unité Tas3 du complexe nucléaire RITS de *Saccharomyces pombe* possède également des répétitions GW qui lui permettent de contacter directement AGO1 et ainsi de guider le « silencing » transcriptionnel des séquences centromériques et du locus « mating type ». Les protéines de la famille ARGONAUTE sont connues dans le « silencing » post-transcriptionnel pour lier les siRNA (Qi et al., 2006) et les utiliser pour cibler un ARN en particulier. Cependant le rôle qu'AGO4 joue en partenariat avec NRPD1b n'est pas clairement défini : on pourrait imaginer qu'AGO4 module les fonctions de NRPD1b ou, à l'inverse, NRPD1b pourrait agir sur la régulation des fonctions de AGO4 (Till et Ladurner, 2007).

Une autre protéine de la famille ARGONAUTE, AGO6, a fait l'objet d'une étude récente montrant notamment que la mutation *ago6* engendrait une diminution de siRNA endogènes et de la méthylation ADN associée d'un certain nombre de loci (*AtSN1*, *MEA-ISR* par exemple) (Zheng et al., 2007). Ceci révèle qu'AGO6 est spécifiquement impliquée dans le processus de « silencing » transcriptionnel, et de manière directe ou indirecte, dans la synthèse de siRNA hétérochromatiques. La fonction d'AGO6 est donc partiellement redondante avec celle d'AGO4, cependant à ce jour aucune évidence expérimentale ne supporte un éventuel partenariat avec NRPD1b.

2.4.2.3.DRM

Chez *Arabidopsis thaliana*, la mise en place de la méthylation *de novo* dépend exclusivement de l'intervention de la protéine DRM2 (Cao et al., 2003; Cao et Jacobsen, 2002b). Les études réalisées sur l'ARN polymérase IV ont démontré une

perte de la méthylation asymétrique de l'ADNr 5S, des séquences LTR et *AtSN1* (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005) mais également de séquences transgéniques (Herr et al., 2005). DRM2 utilise très probablement les siRNA liés par les protéines AGO pour cibler son action, la méthylation *de novo* étant en effet totalement abolie dans un mutant *drm2* (Cao et al., 2003; Cao et Jacobsen, 2002b). Le fait que le silencing ne soit pas total dans un mutant *ago4* pourrait venir de la redondance d'activité des protéines AGO.

2.4.2.4.DMS3

Lors d'un récent crible visant à identifier des protéines responsables de perte de « silencing » méristématique, Kanno et al. (2008) ont pu mettre en évidence que la mutation *dms3* entraîne une baisse de la méthylation de l'ADNr 5S et d'une séquence LTR présente dans une construction rapportrice. Le patron de méthylation de *dms3* est similaire à celui observé dans *drd1*, *nrpd1b* et *nrpd2a*. Dans le mutant *dms3* les siRNA hétérochromatiques siRNA1003 (ciblant les séquences intergéniques de l'ADNr 5S) sont retrouvés dans des quantités proches de ce qui est observé en contexte sauvage, indiquant donc que DMS3 n'est pas impliqué dans la synthèse de ces siRNA mais aurait plutôt un rôle dans les dernières étapes du processus de « silencing ».

Le gène *DMS3* code pour une protéine inconnue de 420 acides aminés possédant un domaine de type « hinge ». Les domaines « hinge » sont notamment retrouvés chez les protéines SMC (« Structural Maintenance of Chromosome ») qui sont des ATPases très conservées durant l'évolution. Les protéines authentiques SMC, plus grosses que DMS3, possèdent un domaine « hinge » central encadré par deux domaines « coiled-coil ». Chez les eucaryotes, les protéines SMC, au nombre de six, sont capables de s'hétérodimériser et sont intégrées dans des complexes impliqués dans la cohésion des chromatides sœurs, la compaction et la ségrégation des chromosomes, la réparation de l'ADN ou bien encore dans les phénomènes de check-point intervenant dans le cycle cellulaire. Il a été démontré que les régions « hinge » de l'hétérodimère SMC1-SMC3 et une portion de domaines « coiled-coil » sont suffisants à la dimérisation et à la fixation de l'ADN. Le rôle de DMS3 dans la RdDM est pour l'instant inconnu, mais à la vue de sa petite taille, les auteurs

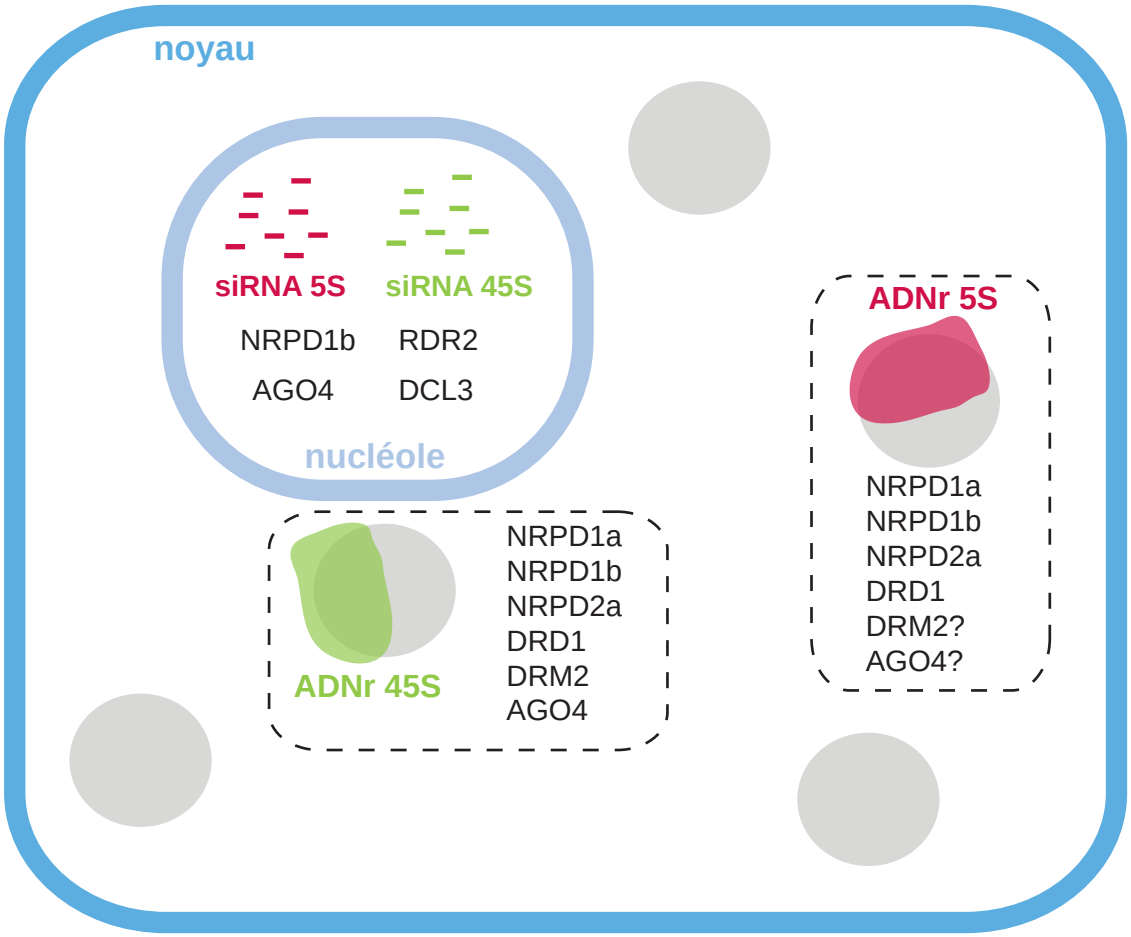


Figure 15: Localisation de partenaires de la voie ARN polymérase IV dans le nucléole et à deux cibles génomiques: l'ADNr 5S et l'ADNr 45S. Cette représentation est basée sur des résultats d'analyses cytologiques. Les encadrés en pointillés indiquent une localisation des différents partenaires aux loci d'ADNr 5S et d'ADNr 45S. Les colocalisations de DRM2 et AGO4 avec l'ADNr 5S n'ont pas encore été démontrées.

suggèrent que DMS3 puisse former des homodimères ayant pour but de stabiliser des complexes siRNA/ADN ou siRNA/ARN (Kanno et al., 2008).

2.5.Localisation nucléaire des protéines intervenant dans la voie Pol IV

Afin de mieux comprendre les mécanismes de RdDM impliquant l'ARN polymérase IV, Pontes et al. ont réalisé une série d'expériences d'immunolocalisation. Les résultats obtenus nous renseignent sur les dépendances mutuelles des partenaires ainsi que sur la chronologie des évènements entraînant le « silencing » et les modifications de la chromatine (Pontes et al., 2006) (Figure 15).

Dans un premier temps, il était nécessaire de connaître le lieu de synthèse et de maturation des siRNA. Pour la plupart des cibles étudiées (ADNr 45S, ADNr 5S et élément transposable *Copia*) les siRNA correspondants se trouvent localisés au sein du nucléole. Seuls les siRNA *AtSN1* montrent une localisation nucléoplasmique et nucléolaire. Le nucléole est surtout connu comme étant le site de synthèse des pré-ARNr 45S et d'assemblage des ribosomes. Cependant de nombreux évènements de maturation s'y déroulent comme, par exemple, la pseudouridylation, la méthylation et le clivage des pré-ARNr ; la maturation des ARNt par la RNAse P et la maturation de certains ARNm (Bertrand et al., 1998; Kiss et al., 2002; Pederson, 1998). De manière intéressante, les siRNA localisés dans le nucléole en contexte sauvage en sont absents chez les mutants *nrpd2a*, *nrpd1a*, *nrpd1b*, *rdr2*, *dcl3* et *ago4*.

L'immunolocalisation des protéines intervenant dans la RdDM nous apprend que RDR2, DCL3, AGO4 sont principalement présentes dans le nucléole. NRPD1b, retrouvée dans le nucléole et le nucléoplasme, présente une forte colocalisation nucléolaire avec RDR2, DCL3, AGO4 et les siRNA étudiés. Les auteurs ont donc proposé que le nucléole serait un centre de maturation pour les siRNA dans lequel RDR2 fabriquerait les ARNdb pris en charge et clivés par DCL3. Les siRNA ainsi obtenus seraient chargés dans le complexe RISC (« RNA Induced Silencing Complex » formé d'AGO4 et NRPD1b). Puis le complexe RISC sortirait du nucléole pour s'associer à NRPD2a, dont la localisation est exclusivement nucléoplasmique, et qui montre de la colocalisation avec NRPD1b. NRPD1a et NRPD2a sont exclues

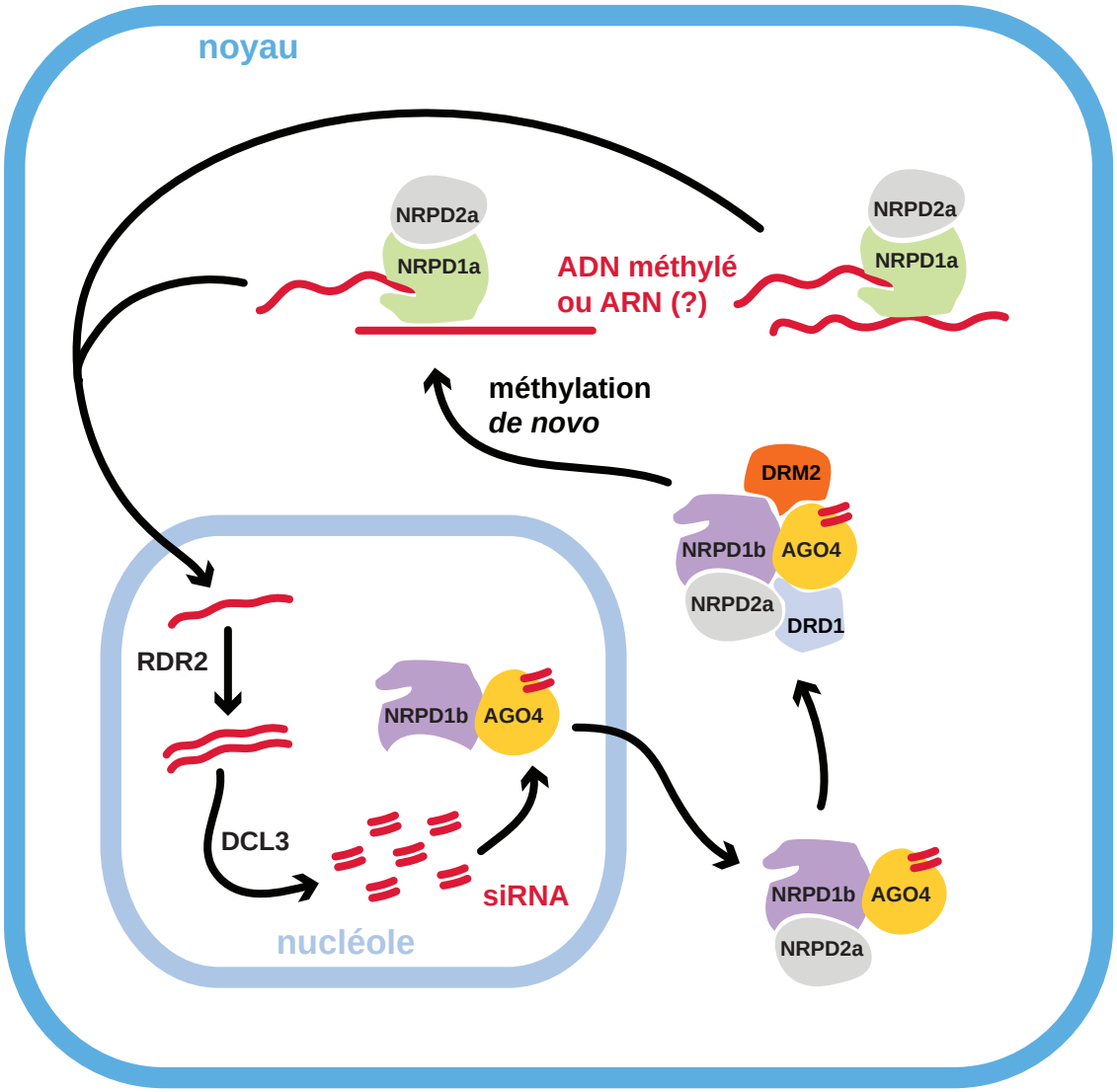


Figure 16: Un modèle d'action de l'ARN polymérase IV. Un ADN méthylé ou un ARN serait transcrit par l'ARN polymérase IVa. Le transcrit généré serait transféré dans le nucléole pour être transformé en ARN db par RDR2 puis en siRNA 24nt par DCL3. Les siRNA seraient ensuite intégrés au complexe AGO4-NRPD1b. Le complexe AGO4-NRPD1b sortirait du nucléole et s'associerait avec NRPD2a. Enfin, DRD1 et DRM2 seraient recrutés pour installer la méthylation *de novo* sur la cible.

du nucléole et colocalisent en formant des foci disparates au sein du nucléoplasme (Pontes et al., 2006).

La combinaison de la technique FISH et de l'immunolocalisation a permis de détecter des foci NRPD1a, NRPD1b ou NRPD2a colocalisant avec l'ADNr 5S et l'ADNr 45S. De la même façon, DRD1 colocalise avec les chromocentres, qui incluent notamment l'ADNr 5S et l'ADNr 45S. Ceci suggère que Pol IVa, Pol IVb et DRD1 sont présents aux répétitions endogènes probablement pour participer à la synthèse des siRNA ou agir en aval de cette synthèse.

Une étude récente, plus orientée vers AGO4, a permis de préciser sa localisation. En effet, Li et al. (2008) ont pu mettre en évidence la double localisation d'AGO4, dans les corps de Cajals, d'une part, et dans les « AB-bodies » d'autre part. Les corps de Cajal sont des compartiments nucléaires qui ont la capacité d'entrer et sortir du nucléole et sont impliqués dans la maturation de nombreux complexes ribonucléoprotéiques (Boudonck et al., 1999; Cioce et Lamond, 2005). Les « AB-Bodies » quant à eux sont des points de localisation de AGO4 et NRPD1b à proximité des séquences d'ADNr 45S contenant également des protéines comme NRPD2a et DRM2. Le fait de retrouver les « AB-Bodies » à la périphérie de l'ADNr 45S et notamment le fait qu'ils intègrent DRM2 suggère qu'ils soient les sites de la mise en place du « silencing » de ces séquences. Des copies actives d'ADNr 45S pourraient être une cible pour la RdDM, ce qui pourrait permettre une modulation fine de l'activité de ces gènes.

2.6.Deux exemples d'actions probables pour l'ARN polymérase IV

Sur la base des recherches menées ces dernières années, deux modèles ressortent quant au mode d'action de l'ARN polymérase IV. Plusieurs questions demeurent non résolues notamment concernant le substrat de Pol IVa. En effet Pol IVa pourrait utiliser l'ADN méthylé (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005) pour produire des transcrits utilisables par RDR2 ou prendre en charge des transcrits aberrants produits par une autre polymérase (Huettel et al., 2006). Alternativement, Pol IVa pourrait utiliser des transcrits double brins (Pikaard et al., 2008).

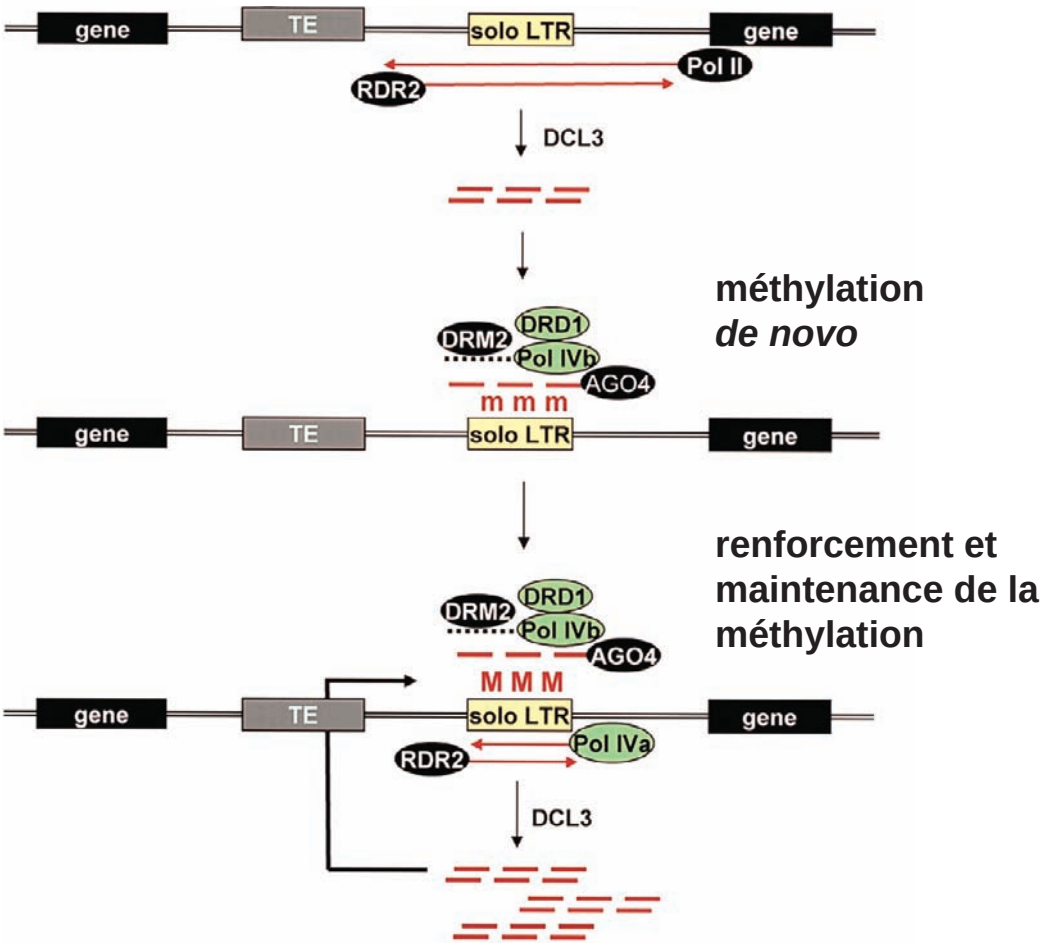


Figure 17: Modèle d'action de l'ARN polymérase IV sur les séquences solo LTR. Ce modèle propose la production de deux vagues de siRNA successives. Un transcrit synthétisé par l'ARN pol II serait pris en charge par RDR2. L'ARNdb formé permettrait la production par DCL3 d'une première vague de siRNA. Ces siRNA dirigeraient la méthylation de novo de la séquence LTR par le complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2. La séquence LTR méthylée pourrait ainsi être transcrite par l'ARN pol IVa. Ces transcrits dépendants de l'ARN pol IVa permettraient la production d'une deuxième vague de siRNA par les actions consécutives de RDR2 et DCL3. Ces siRNA seraient utilisés par le complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2 pour renforcer et maintenir la méthylation de la séquence LTR ciblée. D'après Matzke et al. (2006).

Dans le premier modèle (Figure 16), Pol IVa trancrit un ADN méthylé ou un ARN. Ce transcrit est ensuite dirigé vers le nucléole où il est transformé en ARNdb par RDR2. Cet ARNdb est clivé par DCL3, les siRNA ainsi générés sont pris en charge par un complexe AGO4-NRPD1b. Le complexe siRNA-AGO4-NRPD1b sort du nucléole et NRPD1b s'associe à NRPD2a. Les protéines DRD1 et DRM2 sont ensuite recrutées pour agir sur le locus initialement ciblé par Pol IVa. Il est probable que la méthylation installée par DRM2 puisse activer de nouveau les fonctions Pol IVa sur le locus ciblé. Il a en effet été montré que la méthylation agissait positivement sur la production des siRNA (Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005). Hormis DRM2, il est également possible que Pol IVb soit capable de recruter d'autres protéines de modification de la chromatine telles que par exemple des histones méthyltransférases.

Un autre modèle proposé par le groupe de Matzke (Kanno et al., 2008; Matzke et al., 2006) suggère l'intervention de deux vagues successives de siRNA ainsi qu'un positionnement différent de Pol IVa dans la voie RdDM (Figure 17). Leur modèle, basé sur l'analyse du « silencing » de séquences LTR privilégierait une transcription par l'ARN polymérase II et une prise en charge directe de ces transcrits par RDR2. L'intervention de DCL3 permettrait la création d'une première vague de siRNA qui seraient incorporés dans le complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2 pour diriger la méthylation du locus cible. Cette méthylation nouvellement installée activerait la transcription par Pol IVa et la prise en charge de ces transcrits par RDR2 et DCL3 générant de ce fait une deuxième vague de siRNA. Une nouvelle fois, le complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2 viendrait mettre de la méthylation spécifiquement sur le locus grâce aux siRNA. Ici aussi, la production de siRNA serait renforcée par la présence de méthylation sur la séquence ciblée. Les deux modèles présentés ici sont de l'ordre du probable et il serait hasardeux de les appliquer à toutes les cibles potentielles de l'ARN polymérase IV au vu des dépendances variables qu'entretiennent les loci vis-à-vis de Pol IVa et/ou Pol IVb (Mosher et al., 2008).

2.7.Implications physiologiques de l'activité ARN polymérase IV

Bien que l'ARN polymérase IV ne soit pas essentielle en termes de survie, elle apparaît néanmoins impliquée dans de nombreux évènements liés au développement et aux systèmes de défense de la plante. Des rôles lui sont

notamment attribués dans la floraison, la réponse aux stress biotiques/abiotiques et la propagation des signaux de « silencing ».

2.7.1.L'ARN Pol IV et la floraison

Dans des conditions de croissance en jours courts, un retard de floraison est observé dans les mutants *nrpd1a* et *nrpd1b* ainsi que dans les mutants *rdr2*, *dcl3*, *ago4* ou *drm2* (Chan et al., 2004; Pontier et al., 2005). Les gènes *FCA* et *FPA*, régulateurs de la synchronisation florale, semblent être également impliqués dans la voie RdDM même s'ils ne sont actifs qu'à un nombre limité de loci (Baurle et al., 2007). Deux autres gènes impliqués dans la floraison, FWA et FLC, sont des cibles du « silencing » dirigé par l'ARN polymérase IV (Chan et al., 2004; Swiezewski et al., 2007).

2.7.2.L'ARN Pol IV et la réponse au stress: les voies nat-siRNA et l-siRNA

L'ARN polymérase IV joue un rôle important dans la production des nat-siRNA (« natural antisense transcript siRNA »). Les nat-siRNA dérivent d'ARNdb créés par l'appariement des transcrits d'une paire de gènes. L'un des deux gènes est exprimé constitutivement mais le deuxième ne l'est qu'en condition de stress. C'est le cas, par exemple, pour le couple *P5CDH-SRO5* où *SRO5* n'est actif qu'en réponse à un stress salin. L'appariement des produits de *P5CDH* et *SRO5* forme un ARNdb qui est ensuite transformé en nat-siRNA de 24 nt par un processus incluant les activités de Pol IVa, RDR6, SGS3 et DCL2. Les nat-siRNA générés vont servir de guide pour le clivage des transcrits *P5CDH* et engendrer la production de siRNA 21 nt par DCL1. Cette régulation post-transcriptionnelle permet de diminuer la quantité d'ARNm *P5CDH* dans la cellule entraînant, par là même, l'accumulation de proline qui constitue une réponse physiologique conférant à la plante une plus grande résistance face au stress salin (Borsani et al., 2005).

La voie des nat-siRNA est également appliquée à la réponse aux stress biotiques. Par exemple l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Pseudomonas syringae* provoque l'apparition de nat-siRNA de 22 nt selon un processus impliquant Pol IVa,

RDR6 et SGS3. Ici DCL2 est remplacée par les activités des protéines DCL1, HYL1 et HEN1 qui sont généralement associées à la voie des miRNA (Katiyar-Agarwal et al., 2006).

Récemment, il a été démontré que l'infection par *Pseudomonas syringae* était également capable d'induire l'expression d'ARN de 39 à 41 nt baptisés l-siRNA (« long siRNA »). Les l-siRNA produits présentent de l'homologie pour la région à l'origine de l'appariement des transcrits *SRRLK* et *AtRAP* induisant ainsi la dérégulation d'*AtRAP* (*AtRAP* étant un régulateur négatif de la réponse à un pathogène). La voie l-siRNA fait notamment intervenir Pol IVa, Pol IVb, RDR6, DCL1, DCL4, AGO7 (Katiyar-Agarwal et al., 2006).

2.7.3.Pol IV et propagation du « silencing »

Une fois le phénomène de « silencing » déclenché, il peut être transmis à toute la plante. L'ARN polymérase IV est nécessaire à la transduction des signaux de « silencing » à courte échelle, c'est-à-dire de cellule à cellule via les plasmodesmes, mais aussi à plus grande échelle en utilisant le phloème. En effet, la transduction à courte échelle semble être dépendante de Pol IVa, RDR2 et DCL4, DCL1, HEN1 et AGO1. Des siRNA de 21 et 24nt sont impliqués mais il apparaît que ce sont les siRNA de 21 nt, résultant de l'action de DCL4, qui représentent le signal mobile de la transmission du « silencing » (Dunoyer et al., 2005; Dunoyer et al., 2006; Smith et al., 2007).

A l'échelle de la plante, la propagation du « silencing » nécessite la présence de Pol IVa, RDR2, RDR6, DCL3 et AGO4. Cependant aucune de ces protéines ne semble impliquée dans la genèse du signal, dont la nature reste à préciser, mais seraient impliquées dans la réception du signal (Brosnan et al., 2007). Les petits ARN produits par la famille DICER ne semblent pas jouer de rôle dans cette propagation, c'est pourquoi il a été proposé que la mobilité du « silencing » repose sur des ARN de grande taille. Une possibilité serait que des ARNdb transitent directement par le phloème à l'instar de certains ARNm (Kim et al., 2001).

Chapitre 4 :
Dynamique de la chromatine

Les travaux de Heitz (Heitz, 1928) chez les mousses lui ont permis de décrire une structure chromosomique particulière restant condensée tout au long du cycle cellulaire. Cette structure aux propriétés particulières fut nommée hétérochromatine. Depuis cette première description, le terme « hétérochromatine » est largement utilisé pour désigner des régions de la chromatine condensées ou contenant des gènes dont l'expression est réprimée. Nous avons vu que des régions hétérochromatiques pouvaient subir des réorganisations, par exemple, dans des mutants de la voie RdDM ou de remodelage de la chromatine. Cependant la réorganisation des structures hétérochromatiques n'intervient pas seulement lors de manipulations génétiques. La dynamique de l'hétérochromatine, et de façon plus large de la chromatine, est utilisée par la cellule durant divers évènements physiologiques notamment pendant le développement ou en réponse à des facteurs environnementaux. Le but de ce chapitre est de présenter quelques aspects de cette propriété mais n'est absolument pas exhaustif.

1.Réorganisation de la chromatine liée à des facteurs environnementaux (le complexe eNoSC)

La synthèse des ARN ribosomiques, et donc la production des ribosomes, est régulée par les capacités nutritionnelles du milieu. La cellule établit de ce fait un équilibre entre l'énergie disponible et la synthèse protéique.

D'une manière générale, chez les mammifères, seulement la moitié des gènes d'ARNr 45S sont considérés comme actifs (Grummt, 2003). Pour une régulation à court terme de la quantité de transcrits (en réponse par exemple à un stress, à la quantité de nutriments disponibles, à des facteurs de croissance) la cellule augmente le taux de transcription des unités d'ADNr actives. Pour une régulation à long terme (par exemple pour modifier le ratio d'unités actives/inactives), la transcription de l'ADNr est redéfinie sur la base de modifications épigénétiques, entraînant donc des modifications de la chromatine. Les unités actives sont caractérisées par la présence de marques typiquement associées à l'euchromatine comme l'hypométhylation de leur séquence promotrice, l'acétylation des histones H3 et H4 et la méthylation H3K4. *A contrario*, les unités considérées comme inactives présentent des caractéristiques hétérochromatiques comme la présence de méthylation histone

H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 ou la méthylation CG de leur promoteur (Santoro et al., 2002). Pour une régulation à long terme, le passage des unités d'un état actif à un état réprimé est assuré par le complexe NoRC (« Nucleolar Remodeling Complex »). Le complexe NoRC, qui inclut une activité SNF2, recrute des histones déacétylases et des ADN méthyltransférases, induisant de fait l'hétérochromatinisation et le « silencing » des séquences ciblées (Santoro et Grummt, 2005).

Récemment, Murayama et al. (Murayama et al., 2008) ont pu mettre en évidence dans des cellules humaines la mise en place d'une régulation épigénétique en réponse à la quantité de nutriments disponibles. En effet, l'identification du complexe eNoSC (« energy-dependent Nucleolar Silencing Complex ») relie la carence en glucose à la mise en place de marques épigénétiques répressives. eNoSC est composé de SIRT1, une histone déacétylase activée par le NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide), l'histone méthyltransférase SUV39h1, et la protéine NML (NUCLEOMETHYLIN) qui a la capacité de lier la méthylation H3K9me2 mais dont la fonction précise est inconnue. Privée de glucose, la concentration d'ATP disponible pour la cellule diminue et le ratio NAD+/NADH augmente. L'augmentation de NAD^+ provoque l'activation du complexe eNoSC *via* SIRT1, entraînant ainsi l'hétérochromatinisation par déacétylation et méthylation des histones. Ce processus permet de réprimer la synthèse d'ARNr, et donc la synthèse protéique, dans des conditions où il est nécessaire pour la cellule d'économiser de l'énergie.

2.Réorganisation de la chromatine et développement

2.1.Durant la phase embryonnaire précoce

Pendant la fécondation, les génomes haploïdes mâle et femelle se trouvent réunis au sein du même cytoplasme. Ces derniers possèdent des organisations chromatiniennes très différentes. Chez les mammifères, alors que le génome ovocytaire possède une structure proche de ce qui est trouvé dans les cellules somatiques, le génome mâle est quant à lui fortement compacté notamment en raison du remplacement des histones par les protamines (Santos et al., 2005). Le but du premier cycle cellulaire est de constituer un zygote en mesure de subir la méiose,

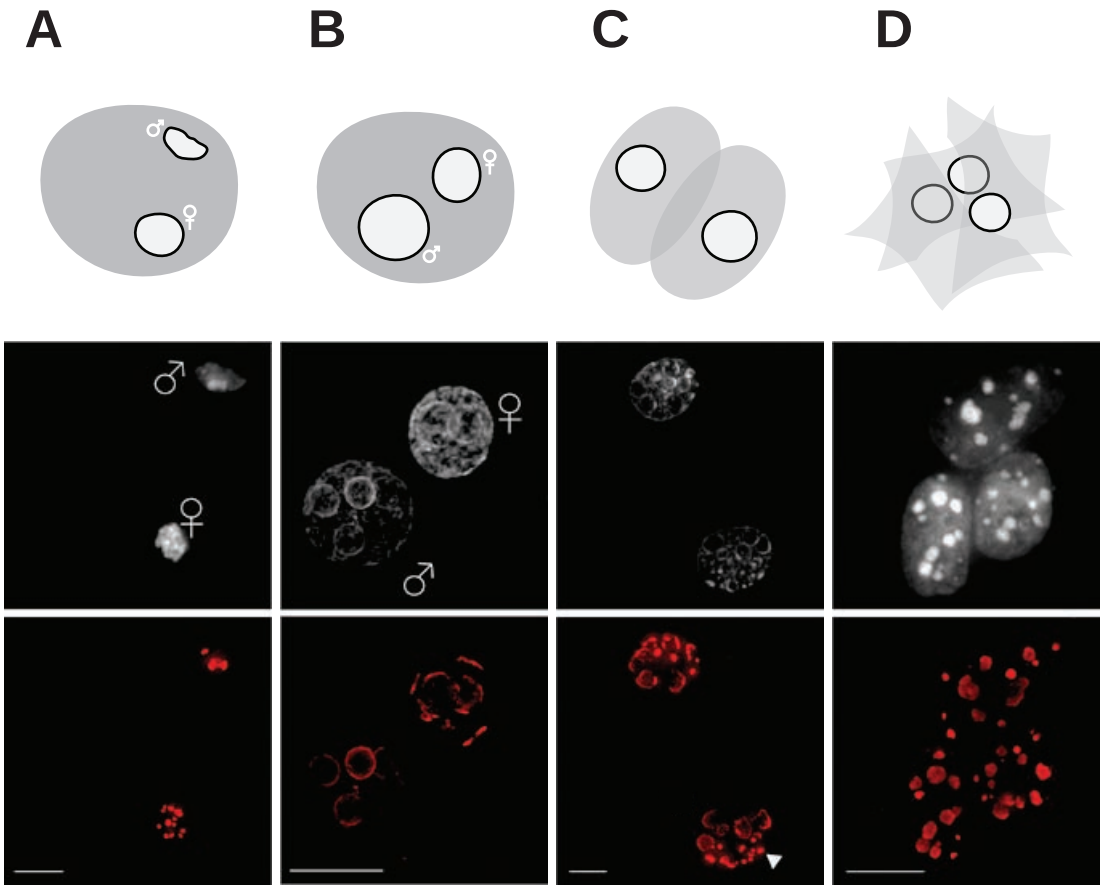


Figure 18: Réorganisation de la chromatine durant les phases précoces de l'embryogenèse chez la souris. (A) Dans l'ovocyte fertilisé, les génomes mâle et femelle sont très condensés. Un marquage FISH (en rouge) permet de visualiser les séquences péricentromériques. **(B)** Les séquences péricentromériques, durant la phase-S du stade une cellule, présentent une structure décondensée sous forme d'anneaux. **(C)** Au début du stade deux cellules, les séquences péricentromériques commencent à adopter une forme compacte (flèche) pour obtenir les noyaux avec des chromocentres disctincts trouvés dans les stades embryonnaires ultérieurs **(D)**. D'après Probst et al. (2008).

pour cela, les deux génomes doivent subir une restructuration de la chromatine centromérique afin d'obtenir des centromères fonctionnels (Figure 18). Durant cette première étape, les deux pronoyaux restent dissociés pour subir réplication de l'ADN et condensation des chromosomes. L'hétérochromatine centromérique adopte alors une structure en anneaux qui ne sera résolue qu'au stade 2 cellules. Enfin, chromosomes mâles et femelles s'alignent sur une ligne métaphasique commune avant de ségréger vers les deux cellules filles (Probst et al., 2007). A ce jour, les mécanismes en charge de la restructuration sont inconnus.

2.2.Durant le phénomène de dédifférenciation cellulaire

Chez les plantes, le traitement de cellule de mésophile en vue d'obtenir des protoplastes induit une dédifférenciation. Chez *Arabidopsis thaliana*, Tessadori et al. (Tessadori et al., 2007) ont pu montrer que cette dédifférenciation s'accompagne d'une forte réorganisation de la chromatine. En effet, les auteurs ont observé une diminution de la fraction hétérochromatique caractérisée par une réduction de la taille et du nombre des chromocentres. Cet évènement est accompagné d'une décondensation de l'ADNr 5S et des répétitions centromériques 180 bp ainsi que d'une dispersion des transposons *Athila*. L'ADNr 45S quant à lui reste partiellement condensé. De manière étonnante, ce remaniement de l'hétérochromatine n'est pas accompagné de déméthylation ADN ou H3K9me2 ni de réactivation d'éléments transposables. Cependant aucune donnée sur la transcription des gènes d'ARNr 5S et d'ARNr 45S n'est disponible pour ce système.

Puis, laissés en culture, les protoplastes montrent de nouveau des structures hétérochromatiques. Le phénomène de recondensation est progressif et corrélé au degré de répétitivité des séquences puisqu'il commence par l'ADNr 45S suivi des répétitions centromériques et de l'ADNr 5S. En effet, la taille des loci pour l'ADNr 45S, les répétitions 180 pb et l'ADNr 5S est respectivement de 3-4 Mb, 1 Mb et 100-300 kb (AGI, 2000; Cloix et al., 2000; Copenhaver et Pikaard, 1996). En revanche, même après plusieurs jours de culture, les éléments répétés tels que les transposons demeurent localisés hors des chromocentres.

Ces résultats mettent en avant la dynamique de la chromatine, et la mise en place des structures hétérochromatiques par la cellule. De plus, ils indiquent qu'il

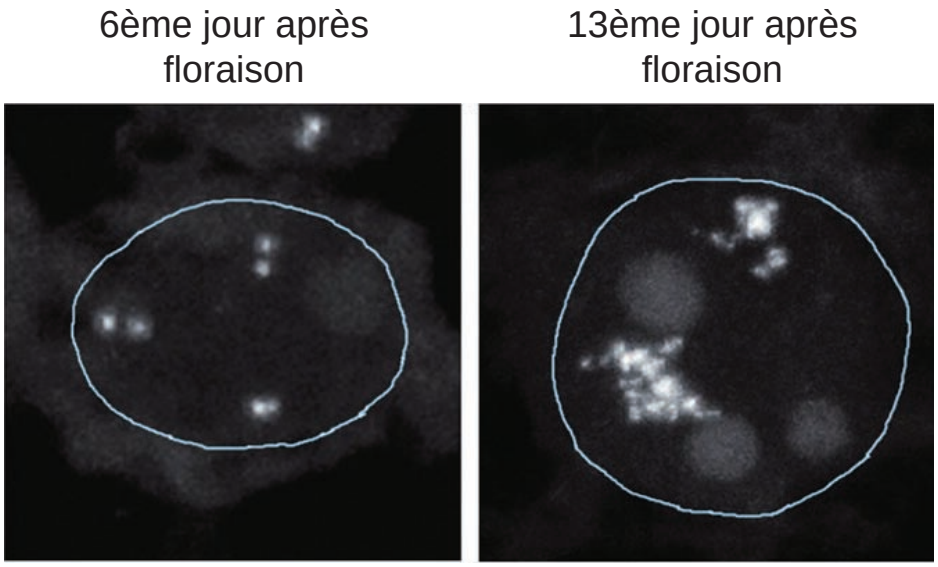


Figure 19: Condensation des loci 1Ax1 transgéniques au 6ème et 13ème jours après floraison chez le maïs. Les deux loci 1Ax1 sont visualisés par la méthode FISH dans les noyaux triploïdes de l'endosperme. Les noyaux sont délimités par une ligne bleue. Au 6ème jour après la floraison, la transcription des transgènes *1Ax1* n'est pas encore effective et les loci sont condensés. Au 13ème jour après floraison, après l'initiation de la transcription des transgènes *1Ax1*, les loci apparaissent fortement décondensés. D'après Wegel (2005).

existe une hiérarchie au sein des séquences répétées, puisqu'il semble exister une corrélation entre la taille de la famille répétée et la chronologie de condensation.

3.Réorganisation de la chromatine et transcription

Nous avons vu que dans de nombreuses situations, les modifications de la chromatine régulent l'activité transcriptionnelle des gènes. Par exemple, il est souvent rapporté que la perte de marques épigénétiques répressives et la décondensation de la chromatine sont corrélées à une réactivation de séquences normalement réprimées. Cependant, les deux cas présentés ci-dessous suggèrent que la situation inverse est également possible, puisqu'ici l'activation transcriptionnelle semble à l'origine des modifications de la chromatine.

Chez le blé, la synthèse des protéines HMW (« High Molecular Weight »), impliquées dans la production du gluten, intervient vers le 8ème jour après la floraison et leurs transcrits sont détectés jusqu'au 38ème jour (Shewry et Halford, 2002). La transformation de plants de blé par une construction incluant le gène *1Ax1* codant pour une protéine HMW a eu pour conséquence la création d'un locus possédant 20 copies répétées en tandem de ce transgène. La construction possédant le promoteur natif, la transcription des gènes *1Ax1* transgéniques est soumise à la même régulation que les gènes *HMW* endogènes. Le groupe de P. Shaw a utilisé cette construction atypique pour mettre en évidence l'influence de la transcription sur la compaction de la chromatine.

Au 6ème jour avant floraison, le locus *1Ax1* transgénique, du fait du grand nombre de répétitions, se présente sous la forme d'un ou deux foci condensés lors de l'observation cytologique. Mais au 13ème jour après floraison, en d'autres termes après l'induction de la transcription des gènes *HMW* endogènes et donc des transgènes, le locus *1Ax1* transgénique présente une forte décondensation. L'analyse transcriptionnelle révèle que les transcrits *1Ax1* sont détectables dès le 8ème jour post-floraison alors que seulement une faible décondensation du locus est observée, suggérant donc que la transcription a précédé la décondensation. Dans ce cas, la transcription serait à l'initiative du remaniement de la chromatine (Wegel et al., 2005).

Une étude similaire menée par le groupe de D. Spector (Janicki et al., 2004) a permis de mettre en évidence la réorganisation d'un locus fortement induite par l'induction de sa transcription. Une construction composée de 24 répétitions du gène *MS2* de bactériophage placées sous le contrôle d'un promoteur CMV inductible a été introduite de façon stable dans des cellules humaines. La construction est retrouvée à hauteur de 200 copies organisées en un locus unique. Lors de l'analyse cytologique en absence d'induction du promoteur, les copies *CMV-MS2* sont trouvées sous la forme d'un foci unique et condensé, associées à de la méthylation H3K9 et à la protéine HP1α. Deux heures après l'induction du promoteur, une décondensation du locus *CMV-MS2* transgénique est observée ainsi qu'une perte de la méthylation histone H3K9 et de l'association avec HP1α. De manière identique à ce qu'ont observé Wegel et al., la détection des transcrits transgéniques précède l'observation de la décondensation. Il serait d'ailleurs probable que la transcription du locus *CMV-MS2* intervienne avant la disparition de la méthylation H3K9 et de la protéine HP1α. Ces marques hétérochromatiques seraient donc enlevées après la mise en place de la transcription.

Objectifs des travaux de thèse

Des travaux réalisés au laboratoire ont pu mettre en évidence une décondensation des loci d'ADNr 5S, entre le 2ème et le 4ème jour de développement post-germination, supposée intervenir dans la mise en place de la transcription des gènes d'ARNr 5S (Mathieu et al., 2003a). Un de mes projets de recherche était d'affiner cette observation et de déterminer où et quand la transcription devenait effective.

Nous nous attendions à une décondensation progressive de l'ADNr 5S associée à l'apparition de boucles euchromatiques permettant l'expression des gènes d'ARNr 5S. Afin de tester cette hypothèse, il nous a paru intéressant d'établir la cinétique permettant l'installation de la structure chromatinienne, partant d'un état très condensé au 2ème jour pour arriver à une situation mature 2 ou 3 jours plus tard.

La description du phénotype mutant pour l'ARN polymérase IV (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005) nous a amené à nous intéresser à cette nouvelle classe de polymérase. En effet Onodera et al. (2005) ont observé en condition *pol IV* (*nrpd2a*) des noyaux présentant une décondensation anormale de l'ADNr 5S. De plus Herr et al. (2005) ont pu démontrer que l'ARN polymérase IV était active dès la première semaine de développement de la plante. Nous avons donc décidé de mener une cinétique de compaction de l'ADNr 5S dans le mutant *nrpd2a* parallèlement à celle que nous réalisions chez la plante sauvage. Ceci nous a permis de démontrer un rôle majeur de l'ARN polymérase IV sur la mise en place des structures hétérochromatiques matures de l'ADNr 5S au début du développement.

Ces résultats ont jeté les bases de la suite de mes travaux de recherche : utiliser l'ADNr 5S pour approfondir nos connaissances sur l'établissement des patrons chromatiniens d'une séquence hétérochromatique. Plus particulièrement, le but de ces recherches était de mieux caractériser le rôle de l'ARN polymérase IV dans ces évènements, et notamment, comprendre le rôle de ses deux formes distinctes Pol IVa et Pol IVb.

Résultats

Article n°1 :

« Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in Arabidopsis thaliana ans Xenopus laevis »

Julien Douet and Sylvette Tourmente

Heredity**,** 2007, 99, 5-13.

Le but de cette revue était d'une part de faire le point sur l'ensemble des informations disponibles sur la régulation épigénétique de l'ADNr 5S chez Arabidopsis ; d'autre part de montrer les ressemblances de cette régulation épigénétique dans un organisme animal : *Xenopus laevis* et un organisme végétal : *Arabidopsis thaliana*.

Cette revue fait le point sur les données structurales et transcriptionnelles de l'ADNr 5S mais aussi sur les régulations épigénétiques s'exerçant sur le 5S. Une table recense les mutants épigénétiques agissant sur les gènes 5S d'Arabidopsis, et notamment les mutants de la voie RdDM que j'ai utilisés pour mes expériences.

Heredity (2007) 99, 5–13
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0018-067X/07 $30.00
www.nature.com/hdy

REVIEW

Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*

J Douet and S Tourmente
Unité Mixte de Recherche CNRS 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, Aubière Cedex, France

5S ribosomal DNA is a highly conserved tandemly repeated multigenic family. As suggested for a long time, we have shown that only a fraction of the 5S rRNA genes are expressed in *Arabidopsis thaliana*. In *Xenopus laevis*, there is a developmental control of the expression of the 5S rRNA genes with only one of the two 5S rDNA families expressed during oogenesis. For both Arabidopsis and Xenopus, the strongest transcription of 5S rRNA, respectively in the seed and during oogenesis is correlated with heterogeneity in the transcribed 5S rRNAs. Epigenetic mechanisms such as modification of the chromatin structure are involved in the transcriptional regulation of the 5S rRNA genes in both organisms. In Arabidopsis, two silencing pathways, methylation-dependent (RNAi) and methylation-independent (MOM pathway), are involved in the silencing of a 5S rDNA fraction.
Heredity (2007) **99**, 5–13; doi:10.1038/sj.hdy.6800964; published online 9 May 2007

Keywords: 5S rDNA; epigenetic; transcription; *Arabidopsis thaliana*; *Xenopus laevis*

Introduction

Higher eukaryotes contain thousands of rRNA genes, and it has been believed for some time that only a fraction of rRNA genes are active, since the number of these genes far exceeds that expected to be required to supply ample cytoplasmic rRNA (reviewed in Rogers and Bendich, 1987).

Eukaryotes regulate the effective dosage of their 45S rRNA genes with fewer than half of the genes being transcribed by polymerase I at any one time. rRNA gene dosage control utilizes a common mechanism with nuclear dominance, a phenomenon in which genetic hybrids transcribe the rRNA genes inherited from one parent, whereas the rRNA genes of the other parent are inactive (Pikaard, 2000). Central to this mechanism is an epigenetic switch in which concerted changes in promoter cytosine methylation density and specific histone modifications dictate the on and off states of rRNA genes (Lawrence *et al.*, 2004).

In most eukaryotes, the 5S rRNA genes are organized as separate clusters of tandem repeats transcribed by RNA polymerase III. There is a substantial literature on 5S rDNA but most reports concern the size of the repeat, its copy number and chromosomal localization obtained from *in situ* hybridizations. In the yeast model, considerable work concerns the characterization of polymerase III transcription machinery components (Geiduschek and Kassavetis, 2001; Ducrot *et al.*, 2006). The first results on the regulation of 5S rDNA transcription were obtained in *Xenopus laevis*, where a developmental control of the 5S rRNA genes expression occurs. The somatic gene family (400 copies organized in tandem) is expressed in both oocytes and somatic cells, whereas the oocyte-type genes (20 000 copies, tandemly arranged on several chromosomes) are only expressed during oogenesis and early embryogenesis when the larger amount of 5S rRNA is synthesized (Peterson *et al.*, 1980). Both families encode a 120 nucleotides (nt) 5S rRNA with a five-nucleotide difference between the oocyte and somatic 5S rRNAs (Ford, 1973; Wolffe, 1994).

In the plant kingdom, results obtained in rice suggest a developmental control of the 5S rRNA genes expression. Two species of 5S rRNA were recovered in 48 h germinated embryos whereas only one was present in ungerminated embryos (Hariharan *et al.*, 1987). In *Arabidopsis thaliana*, different species of 5S rRNA were recovered in tissues like seeds and roots, but this heterogeneity is absent in adult leaves and stems (Mathieu *et al.*, 2003a) implying silencing of the corresponding genes.

For several years our work has focused on the transcriptional regulation of 5S rDNA in *A. thaliana*. This review demonstrates that 5S rDNA is highly regulated at different levels and that epigenetic mechanisms are involved in both *A. thaliana* and *X. laevis*.

Arabidopsis 5S rDNA loci

A. thaliana has approximately thousands of 5S rRNA genes per haploid genome and these occur in tandem arrays (Campell *et al.*, 1992), localized in the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 in the Columbia ecotype (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of chromosome 5)

Correspondence: Dr S Tourmente, Unité Mixte de Recherche CNRS 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
E-mail: sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr
Received 6 December 2006; revised 13 February 2007; accepted 16 February 2007; published online 9 May 2007

(Murata *et al.*, 1997; Fransz *et al.*, 1998; Tutois *et al.*, 1999; Cloix *et al.*, 2000). A typical 5S rDNA unit is 0.5 kb long (Figure 1). It contains a 120 bp transcribed sequence, with an internal promoter and an approximately 380 bp intergenic spacer. The latter contains a TATA-like motif 28 bp upstream the transcribed region, necessary for transcription, and a simple cluster of T residues downstream the transcribed region, used as terminator signal (Cloix *et al.*, 2003). Transcription by RNA polymerase III gives rise to a 120 nt 5S rRNA (Cloix *et al.*, 2002).

In *A. thaliana*, only two 5S rDNA arrays are transcribed

Our *in vivo* and *in vitro* results have revealed that 5S rRNA genes from chromosome 3 and from the small locus of chromosome 5 are not expressed (Figure 2). The presence of numerous mutations in the internal promoter of these genes probably prevents their transcription (Cloix *et al.*, 2003). 5S rRNA genes from chromosome 3 are dispensable since some ecotypes lack these loci without deleterious effects for the plant (Fransz *et al.*, 1998; Tutois *et al.*, 2002).

In vivo and *in vitro* experiments have shown that only two 5S rDNA loci are transcribed in the cell: the locus on chromosome 4 and the large locus on the left arm of chromosome 5 (Figure 2; Cloix *et al.*, 2002, 2003). These two 5S blocks are around 150 kb, each containing around 300 tandemly repeated 5S rDNA units.

5S rRNA genes and 5S rRNA heterogeneity

In Arabidopsis, we identified two types of 5S rRNA genes in each of the two transcribed 5S loci (chromosome 4 and large locus on the left arm of chromosome 5). The first class corresponds to the major genes (which represent 15–20% of the potentially transcribed 5S genes) coding for one 5S rRNA species, whereas the second class contains what we have named the minor 5S rRNA genes (80–85% of the potentially transcribed 5S genes; Figure 2). These latter genes harbor one to three nucleotide substitutions in their transcribed region compared to the major genes (Cloix *et al.*, 2002). We observed that only the major 5S rRNA genes are transcribed in wild-type (WT) 3-week-old leaves (Mathieu *et al.*, 2003a). Since *in vitro* experiments have demonstrated that minor genes have the potential to be transcribed, their silent state must result from an active process. This indicates that inside the two transcribed 5S blocks, only a fraction of the 5S rRNA genes are transcribed (the major genes) with therefore a silencing of the rest of the genes (the minor genes) in WT leaf nuclei.

In the Xenopus model, 5S gene heterogeneity results from the presence of two distinct, physically separated, 5S gene families: the constitutively expressed somatic one and the oocyte one whose expression is restricted to oogenesis. They encode a 120 nt 5S rRNA with a five-nucleotide difference (Ford, 1973).

When the greatest quantities of 5S rRNA are accumulated, that is in the seed and during oogenesis, in Arabidopsis and Xenopus respectively, 5S rRNA heterogeneity is observed. The 5S rRNA heterogeneity depends on tissues and/or developmental stages and implies mechanisms which dictate the on and off states of the corresponding 5S genes.

Methylation of 5S rRNA genes

DNA methylation is one of the major events causing gene repression. In plants, 5–25% of all cytosines are methylated (Rangwala and Richards, 2004).

The tandemly repeated 5S rDNA has been shown to be highly methylated in different plant species: maize (Mascia *et al.*, 1981), wheat (Grellet and Penon, 1984), lupin (Rafalski *et al.*, 1982), pea (Ellis *et al.*, 1988), flax (Goldsbrough *et al.*, 1982) and tobacco (Fulnecek *et al.*, 1998). Using genomic sequencing, we studied the methylation of *A. thaliana* 5S rDNA and found it to be highly methylated (79% of methylated cytosines) at CpG,

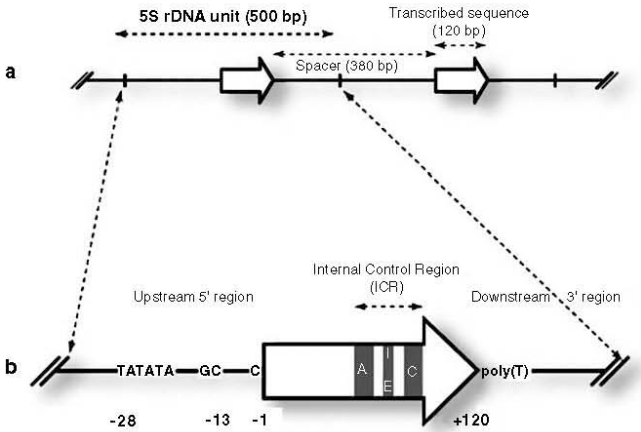


Figure 1 Structure of *A. thaliana* 5S rDNA units. (**a**) Two tandemly organized 5S rDNA units. (**b**) One 5S rDNA unit with the 120 bp-transcribed sequence containing the internal promoter composed of box A (A), intermediate element (IE) and box C (C). The upstream region contains three motifs necessary for transcription at −28, −13 and −1. The downstream region contains the poly-T cluster used as transcription terminator.

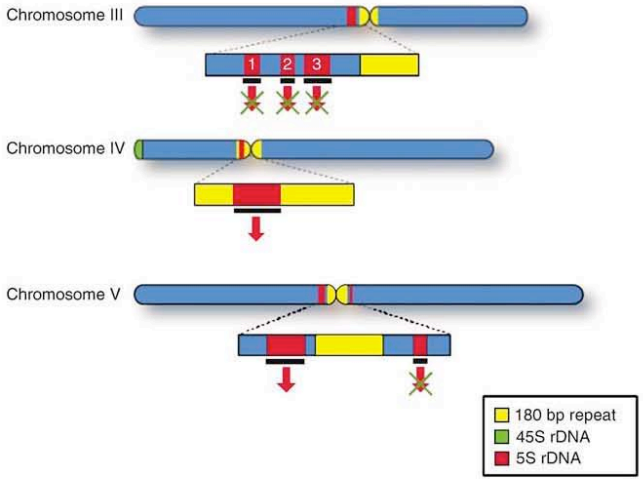


Figure 2 Localization of transcribed and not transcribed 5S rDNA loci. 5S loci (red) are localized in the pericentromeric region (enlarged on the figure) of chromosomes 3, 4 and 5 composed of the 180 bp-satellite (yellow) and other sequences (blue). The loci 1, 2, 3 of chromosome 3 and the small locus of chromosome 5 are not transcribed (crossed arrow). The 5S locus of chromosome 4 and the large locus of chromosome 5 are the only transcribed loci (red arrow). Both contain major and minor 5S genes, which have the ability to be transcribed.

CpNpG and asymmetrical contexts. We also identified a small fraction of less methylated 5S rDNA units (Mathieu *et al.*, 2002), thought to be the transcribed fraction (see later). However, we did not find any nonmethylated 5S genes, suggesting that all 5S genes contain methylated cytosines, probably at degrees depending on their transcriptional activity. We found an inverse correlation between 5S rDNA methylation, studied with methylation-sensitive enzymes, and the proportion of minor 5S rRNA. Minor 5S rRNAs were recovered in roots (13%), in plants treated with the cytosine methylation inhibitor compound 5-azacytidine (22.7%) and in *ddm1* mutant plants (22%, see later), where 5S rDNA is hypomethylated (Mathieu *et al.*, 2003a).

DNA methylation is a stable epigenetic mark for transcriptional gene silencing (TGS). Miller *et al.* (1978) reported that Xenopus oocyte-type 5S rDNA is highly methylated in erythrocytes where it is repressed, although no direct correlation between methylation and transcription has been made. To assess whether methylation impaired transcription, the expression of an *in vitro* methylated 5S gene was checked after injection into Xenopus oocytes. However, the absence of transcription inhibition (Besser *et al.*, 1990) probably revealed that methylation alone was not sufficient to repress transcription, rather than an absence of influence of the methylation on Xenopus 5S rDNA transcription. According to Santoro and Grummt (2001), no transcription repression was observed presumably because the DNA was not properly packaged into nucleosomes. Similarly, *in vitro* transcription of an Arabidopsis naked 5S rDNA gene or mouse 45S rDNA gene was not impaired by DNA methylation (Santoro and Grummt, 2001; Mathieu *et al.*, 2002). This suggests the requirement for a specific chromatin state for the repression of these genes in the cell.

The RNAi pathway is proposed to be involved in the silencing of 5S rRNA genes in Arabidopsis

Like almost every eukaryote, plants have the potential to neutralize invading nucleic acids and to repress repetitive sequences to prevent deleterious effects on genome stability and expression. These sequences can be repressed transcriptionally (TGS) through DNA methylation, histone methylation and/or chromatin remodeling. Short interfering RNAs (siRNAs) of 21–24 nt, processed from double-stranded RNAs (dsRNAs) derived from the controlled sequences, have a key role in determining the mode and sequence specificity.

In *A. thaliana*, silencing at endogenous repeat loci involves histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation and RNA-directed DNA methylation (RdDM) (Pelissier *et al.*, 1999; Mathieu and Bender, 2004). RdDM is accomplished by the *de novo* cytosine methyltransferase domains rearranged methylase 2 (DRM2) (Cao *et al.*, 2003) and defective in RNA-directed methylation 1 (DRD1) (Kanno *et al.*, 2004), a SWI2/SNF2-related protein. RdDM is correlated with the production of homologous siRNAs. 5S siRNAs are detected in WT plants (Xie *et al.*, 2004) and 5S rDNA is highly methylated at CNN (Mathieu *et al.*, 2002), which is a hallmark of RdDM.

Recent works have proposed the following model for the maintenance of the heterochromatic state at Arabidopsis pericentromeric sequences such as *AtSN1* (small retroelements), 45S and 5S rDNA: transcripts trailing from polymerases (I or III in these cases) that are stalled or slowed by DRM-mediated *de novo* methylation are sensed as aberrant and directly or indirectly become

templates for RNA polymerase IVa (Pol IVa), one of the two forms of the plant-specific nuclear RNA polymerase IV (Pol IV) (Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2005; Vaucheret, 2005). Pol IVa would generate precursor RNA at the endogenous repeats and these transcripts then move to the nucleolus where their complements are generated by RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) transcription. The resulting double-stranded RNA are then diced by dicer-like 3 (DCL3) and loaded into an argonaute 4 (AGO4)-containing effector complex or RNA-induced silencing complex (RISC) within the siRNA processing centers in the nucleolus. Then a subunit of the second Pol IV form, Pol IVb, would associate with AGO4-RISC (Pontes *et al.*, 2006).

How AGO4-RISC-Pol IVb complexes mediate their effect on chromatin modification at target loci is unclear. The resulting compacted chromatin is methylated at DNA, methylated and deacetylated at histones. *De novo* DNA methylation by DRM2, which is predicted to contribute to aberrant RNA production, would provide for positive feedback (Pontes *et al.*, 2006). Although this model is highly probable (5S siRNA accumulation is decreased in *pol IV*, *rdr2*, *dcl3* mutants), it needs to be checked for 5S rDNA transcription level (derepression of minor genes in RNAi pathway mutants). In addition, if RNAi mediates silencing, the initiating trigger RNA needs to be identified. Recently, Mayer *et al.* (2006) reported that long intergenic spacer transcripts, which are processed into smaller intermediate RNAs, are required for heterochromatin and silencing of a subset of mouse 45S rDNA arrays. Whether such transcripts have similar function for 5S rDNA needs to be investigated.

Finally, it is reasonable to assume that the 21–24 nt 5S siRNAs cannot discriminate the major and minor 5S rRNA genes. However, we postulate the existence of a chromatin condensation gradient along the 5S rDNA arrays. It remains to be found whether some structural features of the loci can favor this model and explain the selective repression of the minor 5S rRNA genes.

Involvement of the chromatin structure

Both *in vitro* transcription experiments (Mathieu *et al.*, 2002) and the Pol IV model (Onodera *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2006) suggest the involvement of the chromatin structure in 5S rDNA regulation.

In Arabidopsis, the involvement of chromatin structure in the transcriptional regulation of 5S genes was demonstrated by cytological experiments using the *ddm1* mutant. The *decrease in DNA methylation 1* gene (DDM1) encodes a SWI/SNF2-like chromatin remodeling protein (Jeddeloh *et al.*, 1999; Brzeski and Jerzmanowski, 2003). The *ddm1* mutation is known to cause a substantial demethylation of the genome and a striking decondensation of the chromocenters (Soppe *et al.*, 2002). In leaf nuclei of 3-week-old WT plants, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a 5S rDNA probe revealed that a fraction of 5S rDNA forms loops that emanate from the chromocenters (Figure 3). In this tissue, only the major 5S rRNA was recovered and the transcribed major 5S genes presumably reside in the 5S loops. The 5S rDNA fraction residing in the heterochromatic chromocenters is considered to be silent. In the *ddm1* mutant, larger 5S rDNA loops were observed and some 5S minor genes were expressed with 22% minor 5S rRNA transcripts recovered in 3-week-old leaves (minor 5S rRNAs contain 1–2 nucleotide substitutions compared to the major 5S rRNAs; Mathieu *et al.*, 2003a).

In Xenopus, the involvement of chromatin structure was shown by the appearance of the linker histone H1 in embryonic chromatin, which correlates with the establishment of repression of oocyte-type 5S genes. Histone H1 is available during embryogenesis but not during oogenesis where it is replaced by the B4 variant. Histone H1 may direct the correct positioning of nucleosomes over the oocyte promoter (Chipev and Wolffe, 1992), which suggests significant phasing of nucleosomes influencing transcription factor IIIA (TFIIIA) binding over the promoters (Gottesfeld and Bloomer, 1980; Hayes and Clemens, 1992; Lee *et al.*, 1993; Yang and Hayes, 2003). Changes in chromatin composition, as embryogenesis proceeds, resulting in a compacted chromatin in the presence of histone H1 and leading to the final repression of the oocyte 5S rRNA genes, had a major role in differential gene activity between the two 5S gene families (Wolffe, 1989; Dimitrov *et al.*, 1993; Bouvet *et al.*, 1994; Sera and Wolffe, 1998). It is likely, in plants, that chromatin condensation might be influenced by the position of nucleosomes along the DNA fiber (Martinez-Balbas *et al.*, 1990). In tobacco, 5S rDNA units can be wrapped in a number of alternative nucleosome frames; thus potentially varying accessibility of transcription factors across the 5S rDNA tandem array (Fulnecek *et al.*, 2006).

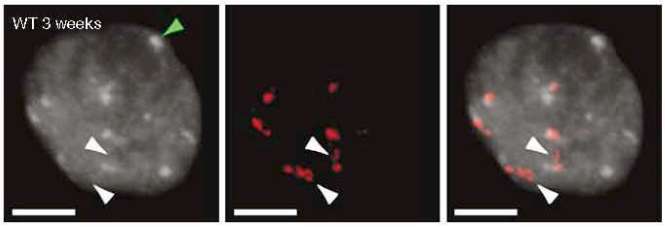


Figure 3 5S rDNA loops emanate from chromocenters in nuclei of 3-week-old plants. The heterochromatic chromocenters are DAPI-stained structures (green arrow). FISH with a 5S rDNA probe (red signal) on 3-week-old nuclei from WT plants. Bar = 5 μm. A fraction of the 5S rDNA signal is located in the heterochromatic chromocenters, while the other fraction forms loops within euchromatin (white arrows). Counterstaining with DAPI (left), FISH with the 5S rDNA probe (middle), and the merge of both (right) are shown.

5S rDNA histone modifications

The combination of DNA and histone modifications (methylation, acetylation, etc.) specifies chromatin structure and determines its transcriptional competence (Jenuwein and Allis, 2001). Transcribed and silent 5S rDNA fractions are therefore expected to contain different histone modifications specific for active and inactive transcriptional states, respectively.

Acetylation of the N-terminal domain of histones weakens the interaction of histones with DNA and facilitates the recognition of binding sites by transcription factors. In Xenopus, *in vitro* experiments from Tse *et al.* (1998) showed that high levels of acetylation completely inhibited higher order folding of 12-mer nucleosomal arrays assembled onto a DNA template consisting of twelve 5S tandem repeats. This was correlated with a large enhancement in the ability of RNA polymerase III to transcribe through the 12-mer nucleosomal arrays. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments conducted by Howe *et al.* (1998) confirmed that the upstream, non-transcribed region of the transcriptionally active Xenopus-somatic 5S genes is packaged with acetylated histone H4, whereas repressed oocyte 5S genes were not.

As already mentioned, silencing at endogenous repeat loci in *A. thaliana* involves RdDM and histone modifications. Lysines of histones H3 and H4 can appear in mono-, di- and trimethylated states (Paik and Kim, 1971; Turner, 2005), which have been recently proposed to reflect functional differences (Dutnall, 2003). In general, methylation of histone H3 lysine 4 has been associated with transcriptionally active genes (Sims *et al.*, 2003). Conversely, methylation of H3K9 has been linked to heterochromatin and gene silencing (Lippman and Martienssen, 2004). Immunocytology has shown that Arabidopsis 5S loops, expected to contain the transcribed fraction, have euchromatic features such as dimethylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me2) and acetylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9Ac), compared to the heterochromatic status (5-methylcytosine and H3K9me2) of the silenced 5S rDNA units colocalizing with the chromocenters (Mathieu *et al.*, 2003a). ChIP experiments have shown that 5S rRNA genes become enriched in the euchromatic marks H3K4me2 and trimethylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) in *ddm1*, resulting from loss of CpG methylation and correlating with the release of silencing of some minor 5S rRNA genes and the larger 5S loops (Mathieu *et al.*, 2003a, 2005) (Table 1).

ChIP experiments revealed that 5S rDNA is also associated with the heterochromatic marks H3K27me1 (monomethylation) and H3K27me2. However these 5S rDNA methylation patterns were both unaffected by CG hypomethylation in *ddm1* and *met1* (CG maintenance DNA methyltransferase) mutants, demonstrating their independence of CG methylation (Mathieu *et al.*, 2005).

Table 1 Histone modifications at *A. thaliana* 5S rDNA

Euchromatin	*Heterochromatin*
H3K4me2	H3K9me2[a]
H3K27me3	H3K27me1[b]
H3K9Ac	H3K27me2[b]

CG methylation directly restrains H3K27me3 (Mathieu *et al.*, 2005).
[a]CG methylation-dependent (Tariq *et al.*, 2003).
[b]CG methylation-independent (Mathieu *et al.*, 2005).

The silenced 5S rDNA fraction is expected to be preferentially associated with these modifications.

Histone methylation depends on histone methyltransferases and the Arabidopsis genome encodes nine H3K9 methyltransferases (Baumbusch *et al.*, 2001), referred as SuvH proteins. Chromomethylase3 (CMT3)-mediated non-CG maintenance methylation (see later) depends on H3K9 methylation. Ebbs and Bender (2006) have shown that the SuvH proteins 4, 5 and 6 make different relative contributions to the maintenance of H3K9 and DNA methylation at different loci, suggesting locus-specific mechanisms for their recruitment or activation. At 5S repeats, SuvH4/kryptonite, SuvH5 and SuvH6 together control CMT3-mediated DNA methylation with the hierarchy SuvH4 > SuvH5 and SuvH5 = SuvH6. They are therefore believed to methylate histones H3 at 5S rDNA, although histone methylation patterns have not been studied in the mutants.

Proteins considered to be involved in epigenetic pathways acting on 5S rDNA are presented in Table 2. In most of the cases, the impact of the proteins has been tested through the analysis of 5S rDNA methylation or accumulation of 5S siRNAs in the corresponding mutants. In some of them, we have also studied the impact of the mutation on 5S rDNA transcription. This is an accurate way to show the impact of a protein when DNA methylation and siRNA accumulation are unaffected in the corresponding mutant.

A new 5S-210 transcript arises from 5S rDNA CG-hypomethylation

In plants, DNA methylation patterns at CG sites are maintained by methyltransferase 1 (MET1), while CMT3 is the major methyltransferase that maintains non-CG methylation at transposable elements and centromeric repeats (Finnegan and Kovac, 2000; Bartee *et al.*, 2001; Lindroth *et al.*, 2001; Tompa *et al.*, 2002; Lippman *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2005). We have investigated 5S rRNA gene silencing in mutants of MET1 and CMT3. The release of 5S gene silencing was tested through the detection of 210 nt-long 5S transcripts (named 5S-210). This extends beyond the 120 bp-transcribed sequence and contains part of the spacer, up to now considered as nontranscribed. The sequencing of 5S-210 transcripts revealed that they only originate from the transcriptionally active 5S repeat clusters (chromosome 4 and large locus on chromosome 5). 5S-210 is observed in *met1* but not in the *cmt3* mutant, indicating that it is mainly under the control of MET1-mediated CG methylation whereas non-CG methylation has little or no influence (Table 2; Vaillant *et al.*, 2006). We actually do not know the function of this transcript and whether the 5S siRNAs derive from this longer transcript.

Surprisingly, combination of *met1* and *cmt3* mutations in the double-mutant releases 5S gene silencing (at 5S-210) to a lesser extent than the *met1* mutation alone, although 5S rDNA methylation was strongly reduced at both CGs and non-CGs (Vaillant *et al.*, 2006). This result points to the existence of additional regulatory pathways acting on 5S rDNA transcription.

5S rDNA is a target of the methylation-independent MOM pathway

Previous studies have identified Morpheus' molecule 1 (MOM1) as a component of a silencing mechanism

Table 2 Mutants of epigenetic pathways acting on 5S rDNA methylation, accumulation of 5S siRNAs or 5S rDNA transcription

Protein/function	*5S rDNA methylation*	*5S siRNA accumulation*	*Minor 5S/210-5S rRNA*	*References*
Pol IVa (RNA polymerase IV)	Reduced at CG, CNG, CNN	Decreased	ND	Onodera *et al.* (2005), Pontes *et al.* (2006)
RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase)	Reduced at CG, CNG, CNN	Decreased	ND	Xie *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2006)
DCL3 (dicer-like)	Reduced at CG, CNG, CNN	Decreased	ND	Xie *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2006)
AGO4 (argonaute)	Reduced at CG, CNG	Decreased	ND	Xie *et al.* (2004), Zilberman *et al.* (2004), Zilberman *et al.* (2003)
Pol IVb (RNA polymerase IV)	Reduced at CG, CNG, CNN	Decreased	ND	Onodera *et al.* (2005), Pontes *et al.* (2006)
DRM2 (domains rearranged methylase)	Reduced at CG, CNG, CNN	Decreased	ND	Elmayan *et al.* (2005), Zilberman *et al.* (2004), Onodera *et al.* (2005)
SuvH 4, 5, 6 (histone H3K9 methyltransferase)	Reduced at CNG	Increased (1) Unchanged (2)	ND	Ebbs and Bender (2006), (1) Elmayan *et al.* (2005), (2) Zilberman *et al.* (2004)
MET1 (DNA methyltransferase)	Reduced at CG, CNG	Increased[a]	5S-210 increased	Onodera *et al.* (2005), Vaillant *et al.* (2006), Elmayan *et al.* (2005)
CMT3 (chromomethyltransferase)	Reduced at CNG	Increased	5S-210 unchanged	Elmayan *et al.* (2005), Vaillant *et al.* (2006)
DDM1 (chromatin remodelling)	Reduced at CG, CNG	Increased[a]	5S-210 increased, minor 5S RNA increased	Mathieu *et al.* (2003a, b), Vaillant *et al.* (2006)
HDA6/SIL1 (histone deacetylase)	Reduced at CNG	Increased	ND	Elmayan *et al.* (2005)
MOM (chromatin remodelling)	Unchanged	Unchanged	5S-210 increased, minor 5S RNA increase	Onodera *et al.* (2005), Vaillant *et al.* (2006), Elmayan *et al.* (2005)

Abbreviation: ND, not determined.
[a]Derepression of 5S-repeat transcription results in the amplification of 5S siRNAs in these mutants.

independent of DNA methylation marks (Amedeo *et al.*, 2000; Steimer *et al.*, 2000; Mittelsten Scheid *et al.*, 2002; Probst *et al.*, 2003). They indicated that MOM1 is essential for silencing of heterochromatic genes and that the methylation-independent silencing MOM1 mechanism reinforces the methylation-based system and prevents extremely rapid epigenetic deregulation in plants with DNA methylation deficiencies (Mittelsten Scheid *et al.*, 2002).

The MOM1 mutation releases silencing of *transcriptionally silent information* (*TSI*) repeats at chromocenters without altering their DNA methylation status (Steimer *et al.*, 2000). The impact of *mom1* on 5S gene silencing was tested and confirmed by the higher proportion of both minor and 5S-210 transcripts in *mom1* than in WT plants, although the dense cytosine methylation of 5S genes remained unaffected (Table 2). Nor were the heterochromatic-specific (H3K9me2, H3K27me2) and euchromatic-specific (H3K4me2, H3K27me3) histone H3 marks at 5S rDNA modified in *mom1* plants (Vaillant *et al.*, 2006). Reverse transcription-polymerase chain reaction and RNA gel blot analyses revealed that the *MOM1* transcript was slightly upregulated in *cmt3* and *met1 cmt3* but not in *met1*, suggesting that *MOM1* transcription is influenced by non-CG methylation. Given that *MOM1* participates in the control of 5S gene silencing, we hypothesized that the upregulation of *MOM1* in *met1 cmt3* might counteract the release of silencing induced by *met1* at 5S genes. In contrast to the situation observed for 5S genes, the *TSI* and the 180 bp (two MOM1 targets) transcripts accumulate to higher levels in *met1 cmt3* than in either single mutant, indicating a synergistic effect of the mutations on release of silencing at these repeats and therefore a specific behavior of 5S rRNA genes (Vaillant *et al.*, 2006).

Other forms of *A. thaliana* 5S rDNA regulation

These epigenetic mechanisms as well as other mechanisms participate in the control of 5S rDNA transcription.

TFIIIA is a limiting factor for 5S rDNA transcription: TFIIIA is a 5S rDNA-specific transcription factor (Engelke *et al.*, 1980). 5S rRNA, subsequently integrated in the large ribosomal subunit, needs to be produced in stoichiometric amounts with 45S rRNA. Our results revealed a good correlation between levels of AtTFIIIA mRNA and 5S rRNA (Mathieu *et al.*, 2003b). TFIIIA could act as a limiting factor; for example, the transcription of additional minor 5S genes in *ddm1* does not result in enhanced quantities of the 120 nt 5S rRNA. Therefore, TFIIIA seems to be an additional level of 5S rDNA transcriptional regulation (Mathieu *et al.*, 2003a).

Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III: The tRNA and 5S rDNA transcription complexes are known to be highly stable and can initiate multiple

Goldsbrough PB, Ellis TH, Lomonossoff GP (1982). Sequence variation and methylation of the flax 5S RNA genes. *Nucleic Acids Res* **10**: 4501–4514.

Gottesfeld JM, Bloomer LS (1980). Nonrandom alignment of nucleosomes on 5S RNA genes of X. laevis. *Cell* **21**: 751–760.

Grellet F, Penon P (1984). Chromatin organization and methylation patterns of wheat 5S RNA genes. *Plant Sci Lett* **37**: 129–136.

Hariharan N, Reddy PS, Padayatty JD (1987). 5S-rRNA genes in rice embryos. *Plant Mol Biol* **9**: 443–451.

Hayes JJ, Clemens KR (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.

Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**: 118–120.

Howe L, Ranalli TA, Allis CD, Ausio J (1998). Transcriptionally active *Xenopus laevis* somatic 5 S ribosomal RNA genes are packaged with hyperacetylated histone H4, whereas transcriptionally silent oocyte genes are not. *J Biol Chem* **273**: 20693–20696.

Jahn D, Wingender E, Seifart KH (1987). Transcription complexes for various class III genes differ in parameters of formation and stability towards salt. *J Mol Biol* **193**: 303–313.

Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**: 94–97.

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* **293**: 1074–1080.

Kanno T, Huettel B, Mette MF, Aufsatz W, Jaligot E, Daxinger L *et al.* (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet* **37**: 761–765.

Kanno T, Mette MF, Kreil DP, Aufsatz W, Matzke M, Matzke AJ (2004). Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* **14**: 801–805.

Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N *et al.* (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* **13**: 599–609.

Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73–84.

Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S *et al.* (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**: 2077–2080.

Lippman Z, Martienssen R (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**: 364–370.

Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T, Martienssen R (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol* **1**: E67.

Martinez-Balbas A, Rodriguez-Campos A, Garcia-Ramirez M, Sainz J, Carrera P, Aymami J *et al.* (1990). Satellite DNAs contain sequences that induced curvature. *Biochemistry* **29**: 2342–2348.

Mascia PN, Rubenstein I, Phillips RL, Wang AS, Xiang LZ (1981). Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. *Gene* **15**: 7–20.

Mathieu O, Bender J (2004). RNA-directed DNA methylation. *J Cell Sci* **117**: 4881–4888.

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

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

Mathieu O, Yukawa Y, Sugiura M, Picard G, Tourmente S (2002). 5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J* **29**: 313–323.

Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R (2006). Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell* **22**: 351–361.

Miller JR, Cartwright EM, Brownlee GG, Fedoroff NV, Brown DD (1978). The nucleotide sequence of oocyte 5S DNA in *Xenopus laevis*. II. The GC-rich region. *Cell* **13**: 717–725.

Mittelsten Scheid O, Probst AV, Afsar K, Paszkowski J (2002). Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13659–13662.

Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F (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.

Onodera Y, Haag JR, Ream T, Nunes PC, Pontes O, Pikaard CS (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**: 613–622.

Paik WK, Kim S (1971). Protein methylation. *Science* **174**: 114–119.

Pelissier T, Thalmeir S, Kempe D, Sanger HL, Wassenegger M (1999). Heavy de novo methylation at symmetrical and nonsymmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res* **27**: 1625–1634.

Peterson RC, Doering JL, Brown DD (1980). Characterization of two xenopus somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. *Cell* **20**: 131–141.

Pikaard CS (2000). The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet* **16**: 495–500.

Pontes O, Li CF, Nunes PC, Haag J, Ream T, Vitins A *et al.* (2006). The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* **126**: 79–92.

Pontier D, Yahubyan G, Vega D, Bulski A, Saez-Vasquez J, Hakimi MA *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.

Probst AV, Fransz PF, Paszkowski J, Mittelsten Scheid O (2003). Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J* **33**: 743–749.

Rafalski JA, Wiewiorowski M, Soll D (1982). Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Nucleic Acids Res* **10**: 7635–7642.

Rangwala SH, Richards EJ (2004). The value-added genome: building and maintaining genomic cytosine methylation landscapes. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 686–691.

Rogers SO, Bendich AJ (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in intergenic spacer. *Plant Mol Biol* **9**: 509–520.

Santoro R, Grummt I (2001). Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell* **8**: 719–725.

Sera T, Wolffe AP (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.

Sims III RJ, Nishioka K, Reinberg D (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**: 629–639.

Soppe WJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS *et al.* (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J* **21**: 6549–6559.

rounds of transcription (Sprague, 1995). In yeast, Dieci and Sentenac (1996) have shown that the terminator element appears to be required for polymerase III to enter the reinitiation pathway. Polymerase III preferentially recycles on the same template, in a way that allows it to complete new cycles more rapidly than the initial one. Accordingly, Jahn *et al.* (1987) provided some evidence that human Pol III is retained in the original transcription complex during the normal reinitiation process. Using *in vitro* transcription experiments, we (Cloix *et al.*, 2003) and Yukawa *et al.* (2000) have shown that the 5′ TATA motif is important for reinitiation of respectively 5S rRNA and tRNA genes both transcribed by the RNA polymerase III. Whether this is also the case *in vivo* is not yet known.

Conclusion

In conclusion, this review shows that 5S rDNA is a subject of specific epigenetic regulations. The high conservation of the 5S genes in terms of repetitivity, structure, DNA methylation, etc. suggests that epigenetic mechanisms are also involved in 5S rDNA regulation in other organisms.

Numerous experiments remain to be done to characterize new regulating pathways acting on 5S rDNA. The DNA repair pathway is one of them. Proteins acting in DNA repair pathway are required for maintenance of TGS at targets like *Athila* and *TSI* retrotransposons. The proteins BRU1, RPA2, FAS1 and 2 (chromatin-associated factors) do not affect DNA methylation, but *bru1*, *fas1* and *fas2* mutants increased 5S siRNA accumulation suggesting they may participate in 5S gene silencing (Elmayan *et al.*, 2005). The finding that methyl-CpG-binding domain proteins (MBDs) associate with histone deacetylases in plants (Zemach and Grafi, 2003) suggests that MBDs may induce heterochromatin formation by coordinating the activities of histone deacetylases and histone methyltransferases. Experiments need to be carried out to show the binding of MBD proteins on 5S rDNA (at least the repressed heterochromatic fraction).

Acknowledgements

We thank C White for comments and English corrections. The laboratory acknowledges grant funding from the INCA (Institut National du Cancer, réseau Epipro), and from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (ACI BCMS 045486).

References

Amedeo P, Habu Y, Afsar K, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J (2000). Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* **405**: 203–206.

Bartee L, Malagnac F, Bender J (2001). Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev* **15**: 1753–1758.

Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R *et al.* (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res* **29**: 4319–4333.

Besser D, Gotz F, Schulze-Forster K, Wagner H, Kroger H, Simon D (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.

Bouvet P, Dimitrov S, Wolffe AP (1994). Specific regulation of Xenopus chromosomal 5S rRNA gene transcription *in vivo* by histone H1. *Genes Dev* **8**: 1147–1159.

Brzeski J, Jerzmanowski A (2003). Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem* **278**: 823–828.

Campell BR, Song Y, Posch TE, Cullis CA, Town CD (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **112**: 225–228.

Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M *et al.* (2003). Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* **13**: 2212–2217.

Chipev CC, Wolffe AP (1992). Chromosomal organization of *Xenopus laevis* oocyte and somatic 5S rRNA genes *in vivo*. *Mol Cell Biol* **12**: 45–55.

Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol MC, Picard G *et al.* (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 MC *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, Yukawa Y, Tutois S, Sugiura M, Tourmente S (2003). *In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the Arabidopsis thaliana 5S rRNA genes. *Plant J* **35**: 251–261.

Dieci G, Sentenac A (1996). Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* **84**: 245–252.

Dimitrov S, Almouzni G, Dasso M, Wolffe AP (1993). Chromatin transitions during early Xenopus embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev Biol* **160**: 214–227.

Ducrot C, Lefebvre O, Landrieux E, Guirouilh-Barbat J, Sentenac A, Acker J (2006). Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem* **281**: 11685–11692.

Dutnall RN (2003). Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out!. *Mol Cell* **12**: 3–4.

Ebbs ML, Bender J (2006). Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* **18**: 1166–1176.

Ellis TH, Lee D, Thomas CM, Simpson PR, Cleary WG, Newman MA *et al.* (1988). 5S rRNA genes in Pisum: sequence, long range and chromosomal organization. *Mol Gen Genet* **214**: 333–342.

Elmayan T, Proux F, Vaucheret H (2005). Arabidopsis RPA2: a genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr Biol* **15**: 1919–1925.

Engelke DR, Ng SY, Shastry BS, Roeder RG (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* **19**: 717–728.

Finnegan EJ, Kovac KA (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* **43**: 189–201.

Ford SA (1973). Different sequences for 5S RNA in kidney cells and ovaries of *Xenopus laevis*. *Nat New Biol* **241**: 7–12.

Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC, Torres-Ruiz RA, Jones G (1998). Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **13**: 867–876.

Fulnecek J, Matyasek R, Kovarik A (2006). Plant 5S rDNA has multiple alternative nucleosome positions. *Genome* **49**: 840–850.

Fulnecek J, Matyasek R, Kovarik A, Bezdek M (1998). Mapping of 5-methylcytosine residues in *Nicotiana tabacum* 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Mol Gen Genet* **259**: 133–141.

Geiduschek EP, Kassavetis GA (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* **310**: 1–26.

Sprague KU (1995). Transcription of eukaryotic tRNA genes. In: Soll D, Rajbhandary UL (eds). *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. American Society for Microbiology: Washington, DC. pp 31–50.

Steimer A, Amedeo P, Afsar K, Fransz P, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J (2000). Endogenous targets of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1165–1178.

Tariq M, Saze H, Probst AV, Lichota J, Habu Y, Paszkowski J (2003). Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8823–8827.

Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, van Steensel B, Henikoff S (2002). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol* **12**: 65–68.

Tran RK, Henikoff JG, Zilberman D, Ditt RF, Jacobsen SE, Henikoff S (2005). DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in Arabidopsis genes. *Curr Biol* **15**: 154–159.

Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**: 4629–4638.

Turner BM (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* **408**: 796–815.

Tutois S, Cloix C, Cuvillier C, Espagnol MC, Lafleuriel J, Picard G *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, Cloix C, Mathieu O, Cuvillier C, Tourmente S (2002). Analysis of 5S rDNA loci among Arabidopsis ecotypes and subspecies. *Genome Lett* **1**: 115–122.

Vaillant I, Schubert I, Tourmente S, Mathieu O (2006). MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep* **7**: 1273–1278.

Vaucheret H (2005). RNA polymerase IV and transcriptional silencing. *Nat Genet* **37**: 659–660.

Wolffe AP (1989). Dominant and specific repression of Xenopus oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. *EMBO J* **8**: 527–537.

Wolffe AP (1994). The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5 S RNA gene regulation. *J Cell Sci* **107**: 2055–2063.

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D *et al*. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* **2**: E104.

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

Yukawa Y, Sugita M, Choisne N, Small I, Sugiura M (2000). The TATA motif, the CAA motif and the poly(T) transcription termination motif are all important for transcription re-initiation on plant tRNA genes. *Plant J* **22**: 439–447.

Zemach A, Grafi G (2003). Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *Plant J* **34**: 565–572.

Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**: 716–719.

Zilberman D, Cao X, Johansen LK, Xie Z, Carrington JC, Jacobsen SE (2004). Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* **14**: 1214–1220.

Article n°2 :

« Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling»

Julien Douet, Bertrand Blanchard, Claudine Cuvillier and Sylvette Tourmente

Plant & Cell Physiology**,** 2008, in press.

Afin de mettre en évidence la dynamique de la chromatine intervenant dans les étapes précoces du développement d'*Arabidopsis thaliana*, des expériences de FISH (« Fluorescent *in situ* Hybridization ») utilisant une sonde d'ADNr 5S ont été réalisées entre les 2ème et 5ème jour après germination. De manière inattendue, il s'est avéré que les loci d'ADNr 5S subissent une forte décondensation suivie d'une recondensation pour obtenir une compaction proche de ce qui est observé dans les noyaux de feuilles adultes. Ce phénomène est accompagné de l'apparition puis de la disparition de foci hétérochromatiques dont l'origine, malgré nos efforts, demeure inconnue.

La réalisation d'expériences similaires dans le mutant *nrpd2a* nous a révélé que l'ARN polymérase IV est largement impliquée dans l'évènement de recondensation puisque dans ce mutant l'ADNr 5S reste décondensé.

L'utilisation de l'enzyme de restriction sensible à la méthylation HaeIII indique que les séquences d'ADNr 5S subissent une déméthylation active qui est attribuable en partie à l'activité de la déméthylase ROS1. De plus, dans le mutant *ros1* la décondensation des gènes d'ARNr 5S n'a pas été observée.

Ces résultats démontrent la nécessité d'un remodelage de l'ADNr 5S dans les jours suivant la germination pour permettre la mise en place d'une structure chromatinienne mature permettant vraisemblablement une expression optimale des gènes d'ARNr 5S. Ce remodelage repose sur les activités quasi simultanées de l'ARN polymérase IV et de la déméthylase ROS1.

Plant Cell Physiol. 49(12): 1783–1791 (2008)
doi:10.1093/pcp/pcn152, available online at www.pcp.oxfordjournals.org
© The Author 2008. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Interplay of RNA Pol IV and ROS1 During Post-Embryonic 5S rDNA Chromatin Remodeling

Julien Douet [1], Bertrand Blanchard [1,2], Claudine Cuvillier [1] and Sylvette Tourmente [1,*]
[1] *CNRS, UMR 6247 GReD, Clermont Université, INSERM, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France*

We have investigated the chromatin structure of 5S rDNA, a heterochromatic pericentromeric tandemly repeated family, at 2, 3, 4 and 5 days post-germination. Our results revealed a large-scale reorganization of 5S rDNA chromatin that occurs during the first days of development. Unexpectedly, there is a decondensation followed by a 're'condensation of 5S rDNA chromatin, to obtain almost mature nuclei 5 d post-germination. The 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 polymerase IV (Pol IV) is essential to the 5S chromatin 're'condensation. In conclusion, Pol IV and ROS1 collaborate to unlock the 5S rDNA chromatin inherited from the seed, and establish adult features.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* — Chromatin — RNA polymerase IV — ROS1 — 5S rDNA.

Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; CC, chromocenter; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; FISH, fluorescence in situ hybridization; NOR, nucleolar organizing region; Pol IV, RNA polymerase IV; RNAi, RNA interference; ROS1, repressor of silencing 1; siRNA, small interfering RNA; TSI, transcriptionally silent information; WT, wild type.

Introduction

In mammals, heterochromatin displays distinct characteristics in different cell types, reflecting the identity of the cell and the developmental stage (Probst and Almouzni 2007). The cell type-specific behaviors underline the particular plasticity of the heterochromatin domain and show that differentiation is associated with changes in heterochromatin features (Keohane et al. 1996, Kobayakawa et al. 2007, Puschendorf et al. 2008). The RNA interference (RNAi) machinery and unidentified RNAs (Maison et al. 2002, Kanellopoulou et al. 2005) have been implicated in the assembly of mammalian centromeric heterochromatin.

Recent work, especially in fission yeast, has shown that a low level of transcription and a functional RNAi pathway are required to maintain heterochromatin (Grewal and Jia 2007). Similarly, the plant-specific RNA polymerase IV (Pol IV) has recently been reported to contribute to small interfering RNA (siRNA) production and shown to be essential to RNA-directed DNA methylation (Herr et al. 2005, Kanno et al. 2005, Onodera et al. 2005, Pontier et al. 2005, Zhang et al. 2007). RNA-directed DNA methylation is the prominent nuclear silencing pathway which guides formation of transcriptionally silent heterochromatin at repeated loci (Brodersen and Voinnet 2006). *Arabidopsis thaliana* contains approximately 1,000 copies of 5S rRNA genes per haploid genome. 5S rDNA is arranged in tandem arrays (Campell et al. 1992) and is located within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of chromosome 5) in the Columbia accession (Murata et al. 1997, Fransz et al. 1998). In a model proposed by Onodera et al. (2005), the AGO4-containing effector complex RISC (RNA-induced silencing complex) is guided by siRNA to drive DNA methylation and chromatin compaction at Arabidopsis pericentromeric sequences such as 5S rDNA (Pikaard 2006). The phenotypes observed in *pol IV* mutant nuclei, lacking 5S siRNA, revealed that 5S genes are typically decondensed, hypomethylated and show significantly less co-localization with heterochromatic centromeres.

We have reported that at 2 d post-germination, the heterochromatin fraction in nuclei of leaves is much smaller than in wild-type (WT) 3-week-old nuclei, i.e. the heterochromatin fraction is composed of pre-chromocenters (pre-CCs) that are much smaller than the CCs observed in 3-week-old nuclei. Fluorescence in situ hybridization (FISH) revealed that 2 days post-germination, the 5S rDNA co-localizes with pre-CCs. In 3-week-old nuclei, part of the 5S rDNA is located within heterochromatic CCs, whereas the other fraction forms loops with euchromatic features that emanate from CCs and were proposed to contain the transcribed 5S rRNA genes (Mathieu et al. 2003). This provides evidence that chromatin needs to be reorganized during development to obtain mature pericentromeric and constitutive heterochromatin.

[2]Present address: CERMAV-CNRS, Université Joseph Fourier, 601 rue de la Chimie, BP53 38041 Grenoble Cedex 9, France.
*Corresponding author: E-mail, sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr; Fax, +33-4-73-40-77-77.

The plant epigenome, like mammals or other epigenomes, responds to developmental cues (Madlung and Comai 2004). It is likely that dynamic changes in DNA methylation status are a key to the plasticity and inheritance of the epigenome. Two opposing pathways, DNA methylation and demethylation, converge at numerous loci scattered throughout the genome (Penterman et al. 2007). This dynamic control may be important in keeping the plant epigenome plastic (Zhu et al. 2007). In Arabidopsis, heterochromatic repeated sequences such as 45S rDNA and many transposons represent loci affected by the DNA demethylase ROS1 (repressor of silencing 1) that has a role in erasing DNA methylation and preventing transcriptional gene silencing (Gong et al. 2002, Kapoor et al. 2005, Agius et al. 2006).

Here we have studied the 5S rDNA chromatin behavior between 2 and 5 d post-germination. A decondensation followed by a 're'condensation of the 5S chromatin is observed.The reorganization of the 5S rDNA chromatin is associated with an active demethylation, at asymmetrical cytosines, mediated by the demethylase ROS1, and the plant-specific Pol IV is essential to the 5S chromatin 're'condensation.

Results

5S rDNA chromatin remodeling occurs during early development

We were interested in investigating the remodeling events that lead to the progressive establishment of a mature heterochromatin organization. We therefore decided to investigate the CC fraction and the chromatin structure of 5S rDNA at 2, 3, 4 and 5 d post-germination.

In agreement with our previous results, in 2-day-old nuclei from cotyledons, the heterochromatic [4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained] CCs were smaller than those in corresponding 3-week-old nuclei (Mathieu et al. 2003) and were considered to represent pre-CCs (Fig. 1A). In 2-day-old nuclei, the 5S rDNA probe predominantly hybridized to the heterochromatic pre-CCs. The 5S signals were compact (Fig. 1A) in 69% of the nuclei (Fig. 1C). Surprisingly, at 3 d post-germination, the 5S signals were strongly decondensed and clearly showed less co-localization with CCs compared with 2-day-old nuclei (Fig. 1A). Only 48% of the nuclei displayed compact 5S signals at this stage (Fig. 1C). At 4 d post-germination, 5S rDNA has begun to 're'condense, giving more compact FISH signals, and the fraction of nuclei which displayed compact 5S signals increased to 54% (Fig. 1A, C). 5S rDNA compaction at 5 d post-germination (Fig. 1C) was similar to that observed in 3-week-old nuclei (Mathieu et al. 2003), signifying that 5S rDNA chromatin structure is roughly fully developed at 5 d post-germination. At this stage, part of the 5S signal co-localizes with heterochromatin whereas the other fraction forms decompacted loops (supposed to contain the transcribed 5S rRNA genes) that emanate from CCs.

Whereas we were expecting a progressive decondensation (from a compacted 5S rDNA chromatin 2 d post-germination to a less compacted one in 5-day-old plants), the results show that starting from 2-day-old nuclei, heterochromatin, and 5S rDNA in particular, undergo a considerable decondensation followed by the 're'condensation of a 5S rDNA fraction to obtain almost mature nuclei 5 d post-germination.

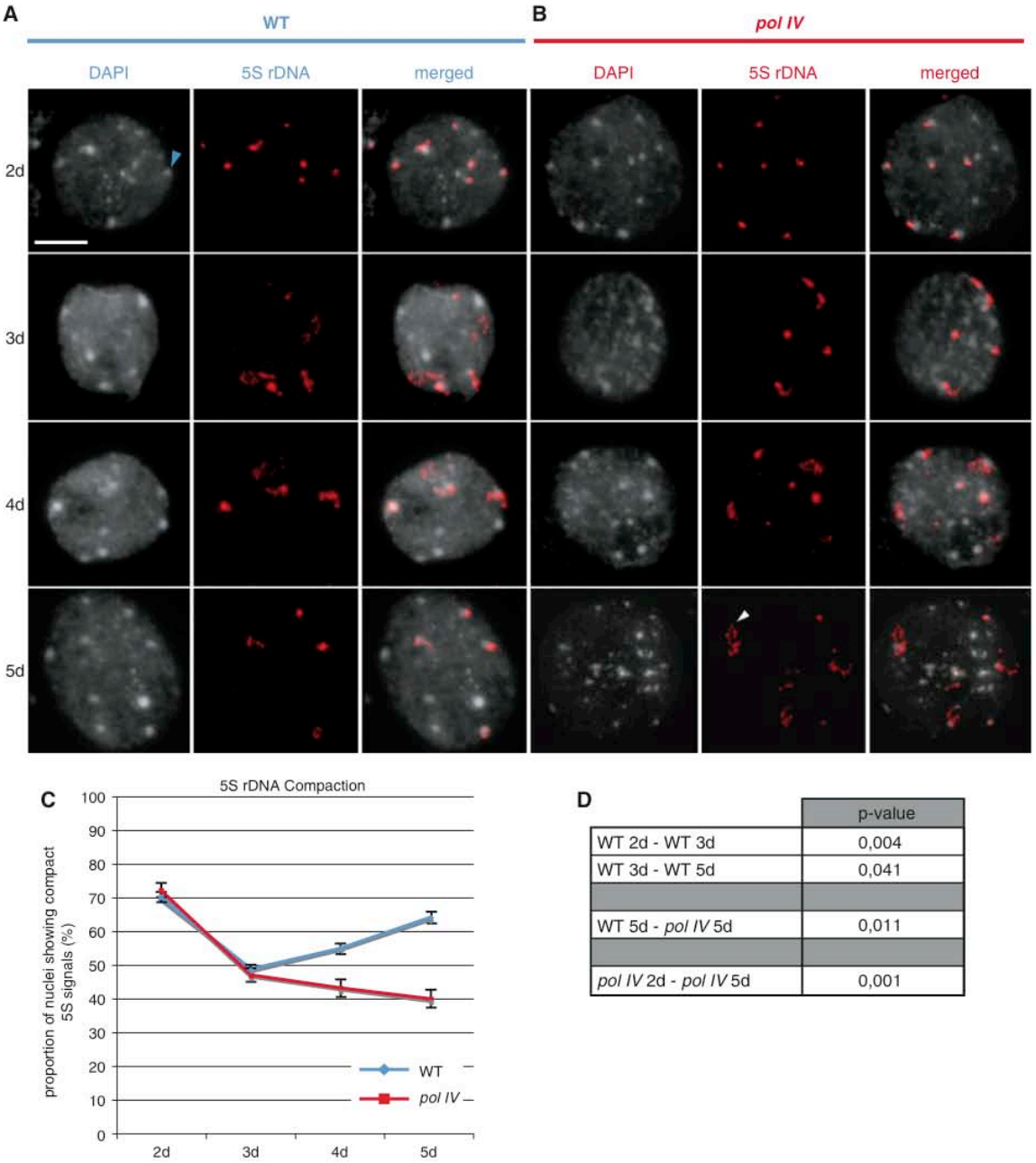
Pol IV is required for 5S rDNA 're'condensation

Compared with WT adult leaf nuclei, the *pol IV* mutant shows an increased number and decreased size of DAPI-positive heterochromatic foci associated with a 5S rDNA decondensation (Onodera et al. 2005). In order to identify pathways implicated in the reorganization of heterochromatin observed in the WT plants, we have investigated the *nrpd2a* Pol IV mutant (NRPD2A is the subunit common to the two Pol IVa and Pol IVb forms). We therefore analyzed remodeling of 5S rDNA repeats and heterochromatin in the *nrpd2a* mutant at 2, 3, 4 and 5 d post-germination.

First, 2- and 3-day-old *nrpd2a* nuclei show the same CCs and 5S signals as WT homologs (Fig. 1B). This is clearly illustrated by an identical proportion of nuclei with compact 5S signals in the WT and the *nrpd2a* mutant (Fig. 1C). The difference between the WT and the *nrpd2a* mutant became obvious 4 d post-germination, with an absence of 're'condensation of 5S chromatin in the mutant, and so the retention of decondensed 5S clusters (Fig. 1B, C). These results show that Pol IV is necessary for the 5S chromatin reorganization observed in WT plants.

Young WT nuclei contain supernumerary heterochromatic foci

Arabidopsis chromosomes ($n = 5$) display small, conspicuous heterochromatin segments (CCs) that mark the position of each (peri-)centromere and of the nucleolus-organizing regions (NORs) of chromosomes 2 and 4 (Fransz et al. 1998, Fransz and de Jong 2002). Fourteen CCs are expected in diploid nuclei, but, due to close association of CCs, most of the nuclei contain <10 CCs (Fransz and de Jong 2002). Surprisingly, WT plants between 3 and 5 d post-germination contained >14 DAPI-stained foci. The excess heterochromatic foci, smaller and distinct from the CCs, termed supernumerary foci (s-foci, Fig. 2A, B), were transient since they were absent in mature WT nuclei (3% of nuclei with s-foci, not shown). A larger proportion of *nrpd2a* nuclei contained s-foci (Fig. 2B) and maintained them (Onodera et al. 2005). These results show



	p-value
WT 2d - WT 3d	0,004
WT 3d - WT 5d	0,041
WT 5d - *pol IV* 5d	0,011
pol IV 2d - *pol IV* 5d	0,001

Fig. 1 5S rDNA chromatin organization in early development. (A and B) Counterstaining with DAPI (left); FISH with a 5S rDNA probe (middle); and the merge of both (right) on nuclei from WT (A) and *pol IV* (*nrpd2a*) plants (B) (Columbia background) at 2, 3, 4 and 5 d post-germination. The blue arrow points to a pre-chromocenter. The white arrow shows a 5S rDNA loop. Bar = 5 µm. (C) Proportion (%) of WT and *pol IV* (*nrpd2a*) nuclei harboring compact 5S signals at different times of development. Nuclei with a maximum of one diffuse 5S rDNA signal were considered as compact whereas nuclei with at least two diffuse 5S signals were considered as decompacted. A compact signal is a punctate signal. For each stage, between 50 and 90 nuclei were observed. The confidence interval is indicated for each value. (D) Table presenting the significant *P*-values of the graph in C, obtained from the one-tailed Z-test.

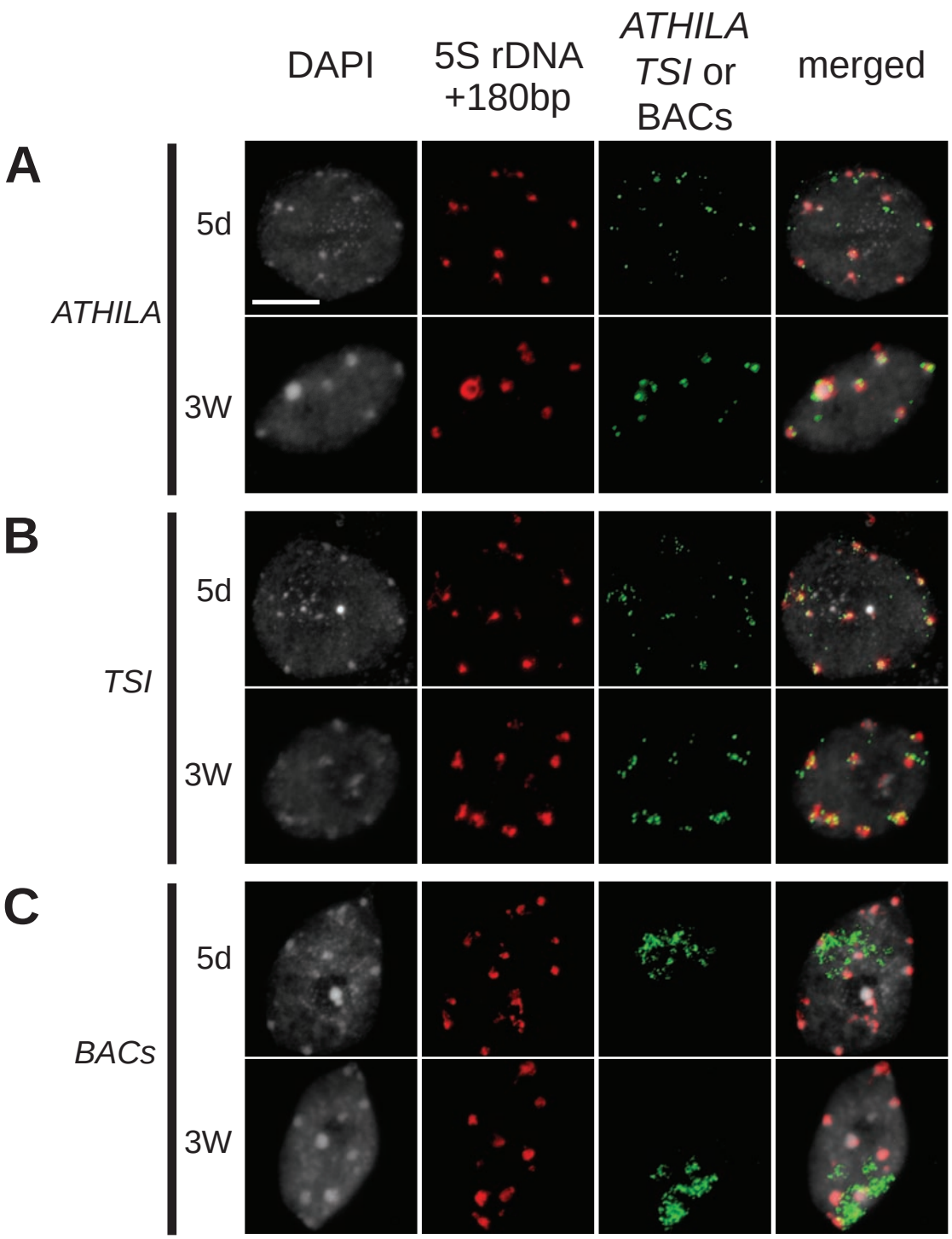


Figure S1: Attempt to characterize s-foci
Nuclei from 5-day-old (5d) and 3-week-old wild-type plants (Columbia background) were hybridized with biotinylated 5S rDNA and 180bp-repeats probes and digoxigenin-labeled ATHILA (A), TSI (B) and BACs matching 2 Mb of the left arm of chromosome 5 (C) probes. Counterstaining with DAPI (left); FISH with a 5S rDNA and 180bp-repeats probes (middle left. Red signal); FISH with ATHILA (A), TSI (B) or BACs matching the left arm of chromosome 5 (C) probes (middle right. Green signal) and the merged image of the three signals (right). Bar = 5 µm.

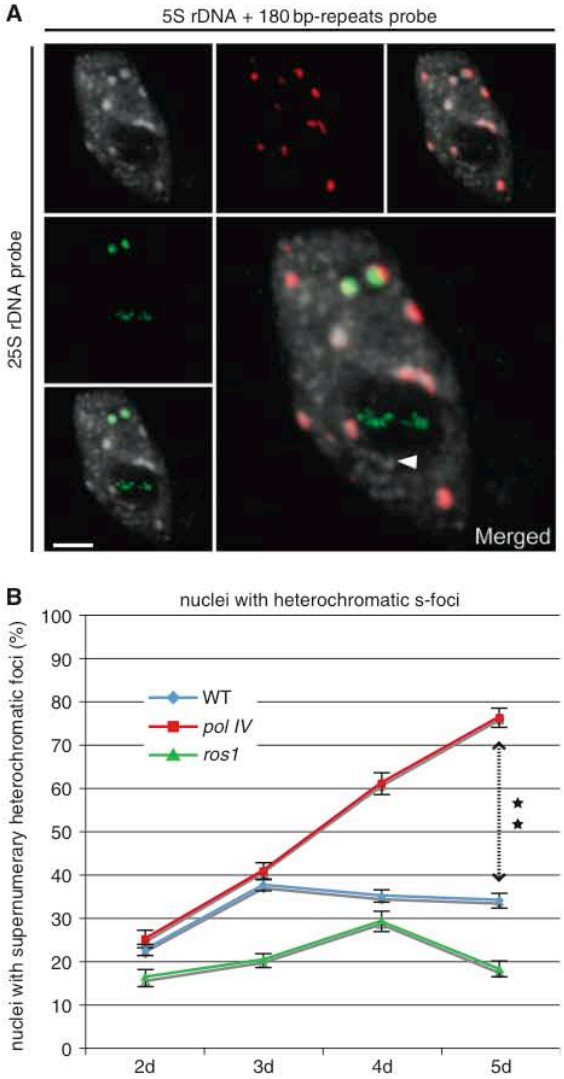


Fig. 2 Analysis of supernumerary foci. (A) Counterstaining with DAPI (top left); FISH with a 25S rDNA probe (green); FISH with a mix of 5S rDNA and 180 bp repeats probes (red); and the merged image on nuclei from 5-day-old WT nuclei. The white arrow shows s-foci, which hybridized with none of the probes. Bar = 5 μm. (B) Proportion (%) of WT, *pol IV* (*nrpd2a*) and *ros1* nuclei containing heterochromatic s-foci at different times of development i.e. the proportion of nuclei containing >14 heterochromatic foci. For each stage, between 50 and 90 nuclei were observed. Asterisks (**$P<0.01$; one-tailed Z-test) indicate significant differences between the WT and *pol IV* values. The confidence interval is indicated for each value.

that Pol IV is necessary for the resorption of the s-foci observed in WT plants.

The s-foci hybridized neither with the 5S rDNA probe, nor with the 180 bp or 25S rDNA probe (Fig. 2A), which are repeated sequences present in the pericentromeric region of chromosomes 3, 4 and 5 (5S rDNA); on chromosomes 2 and 4 (25S rDNA); and in every chromosome centromere (180 bp repeats). (Peri)centromeric sequences such as TSI (transcriptionally silent information) (Steimer et al. 2000) or the Athila retrotransposon (Pelissier et al. 1995) co-localize with CCs in mature 3-week-old nuclei (Supplementary Fig. S1 online). They might provide FISH signals co-localizing with some of these s-foci in plantlet nuclei, therefore revealing a fragmentation of heterochromatin. The other possibility was that sequences which were normally euchromatic might transiently adopt a heterochromatic organization. To test this possibility, we used a probe composed of 13 bacterial artificial chromosomes (BACs) covering the euchromatic region of the chromosome 5 left arm. However, none of these probes (TSI, Athila or BACs) hybridized to these s-foci in 5-day-old nuclei (Supplementary Fig. S1) whose nature remains to be elucidated.

Post-germination changes of 5S rDNA methylation patterns

To determine whether the 5S rDNA chromatin reorganization observed was associated with modification of the 5S rDNA methylation pattern, we performed Southern blotting using methylation-sensitive restriction endonucleases. *Hpa*II cuts CCGG motifs but is inhibited by methylation of either cytosine, corresponding to contexts CG and CXG (with X different from G) (McClelland et al. 1994). *Hae*III recognizes GGCC but will not cut if the inner C is methylated. Digestion of 5S genes with these two enzymes reports on methylation at symmetrical CG/CXG contexts (*HpaII*), and asymmetrical CXX context (*HaeIII*). The Southern blots revealed ladders of bands at 500 bp intervals, the size of a 5S gene repeat (Campell et al. 1992). High levels of methylation cause most of the hybridization signal to be near the top of the ladder, whereas loss of methylation results in more signals near the bottom.

5S gene methylation at *Hpa*II (not shown) and *Hae*III sites was lower in *nrpd2a* mutants relative to their WT siblings, at each developmental stage (Fig. 3).

In WT plants, we observed a faint increase at symmetrical sites with *Hpa*II between 2 and 5 d post-germination, as already described in Mathieu et al. (2003). Interestingly, the *Hae*III digestion revealed a striking decrease of asymmetrical methylation between 2 and 5 d post-germination (Fig. 3).

In the *nrpd2a* mutant, two major observations can be made: first, the asymmetrical methylation revealed by *Hae*III at 5S genes is already lower at 2 days post-germination and remains lower, compared with WT homologs. This means that Pol IV is involved in setting DNA methylation patterns at 5S genes before 2 d of plant

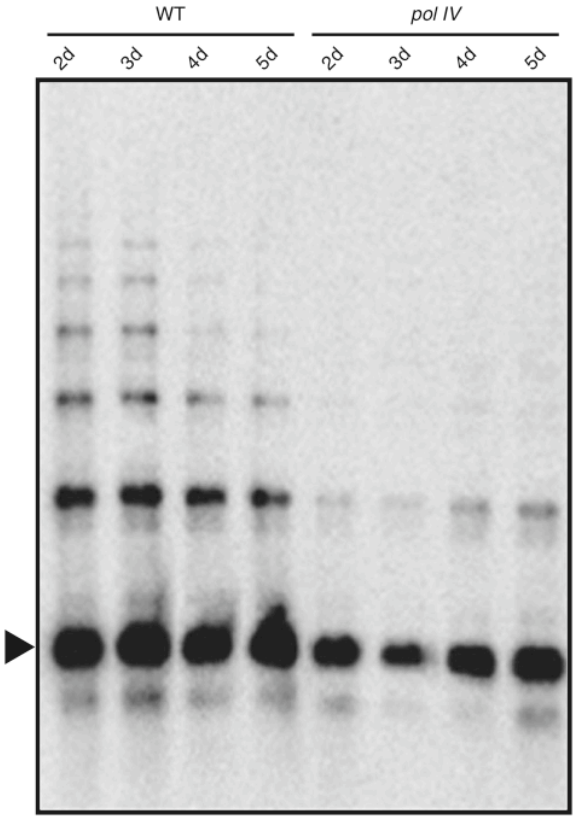


Fig. 3 5S rDNA methylation analysis in WT and *pol IV* plants. Genomic DNA (300 ng) of WT and *pol IV* (*nrpd2a*) genotypes was digested with *Hae*III. The DNA gel-blot was probed with 5S rDNA. Digestions were performed from plants at 2, 3, 4 and 5 d post-germination. The arrowhead shows a 0.5 kb 5S rDNA unit.

development, probably during the seed formation. Secondly, the decrease of asymmetrical DNA methylation observed in WT plants is absent in the *nrpd2a* mutant; however the demethylation is not mediated by Pol IV (see later).

These results show that important 5S rDNA methylation changes (particularly at the CXX position) accompany the major 5S rDNA chromatin remodeling observed between 2 and 5 d post-germination.

ROS1 mediates 5S rDNA demethylation

The absence of replication in the cotyledons between 2 and 5 d post-germination implies that the demethylation observed at 5S rDNA is not a passive process but an active one. Heterochromatic repetitive sequences such as 45S rDNA and many transposons represent targets for the DNA glycosylase/demethylase ROS1 (Gong et al. 2002, Kapoor et al. 2005, Agius et al. 2006). However, 5S rDNA has not been reported yet as a ROS1 target.

To assess the role of ROS1 in the demethylation of 5S rDNA at asymmetrical cytosines during the first days of development, we performed Southern blotting using the methylation-sensitive restriction enzyme *Hae*III and DNA from the WT and the *ros1* mutant at 2 and 5 d post-germination. As shown in Fig. 4A, in the *ros1* mutant the decrease of asymmetrical methylation is absent or nearly absent. We cannot exclude a slight decrease of methylation at the 5 d stage which could be performed by other glycosylases of the DEMETER family strongly expressed at that time (Ortega-Galisteo et al. 2008). These results show that ROS1 is necessary to erase 5S rDNA methylation at CXX positions during the first days of development.

Since methylation and compaction of highly repeated sequences are often correlated, an absence of 5S rDNA chromatin decompaction was expected in *ros1* plants. To confirm the role of ROS1 in 5S rDNA chromatin remodeling during early development, we performed 5S rDNA FISH experiments on *ros1* plants at 2, 3, 4 and 5 d post-germination. First, in contrast to the *pol IV* mutant, the cytological analysis revealed a comparable evolution of the s-foci in *ros1* and WT plants (Fig. 2B). Secondly, FISH experiments support the methylation results obtained by Southern blot. Indeed, the number of nuclei displaying compact 5S rDNA signals was equivalent in WT and *ros1* plants at 2 d post-germination (Fig. 4B, C). However, in 3-day-old nuclei, whereas 5S rDNA underwent a decondensation event in WT seedlings, the decondensation step did not occur in the *ros1* background (65% of nuclei at 2 d vs. 73% in 3-day-old nuclei displayed compact 5S rDNA). Naturally, no 're'condensation event was observed in *ros1* nuclei. Five-day-old *ros1* plants displayed the same proportion of nuclei with compact 5S rDNA as their WT counterpart and showed the same mature features (i.e. part of the signal is euchromatic and the other part is heterochromatic).

These results show the ROS1 independence of s-foci and the role of ROS1 in the decondensation event occurring at 3 d post-germination.

Discussion

The centromere region of Arabidopsis chromosomes consists of the core region which is mainly composed of 180 bp tandem repeats (Haupt et al. 2001) and flanking pericentromeric domains, which contain 5S rDNA, transposons and other dispersed repeats (Fransz et al. 1998, Tutois et al. 1999).

Our previous work prompted us to think that 5S rDNA chromatin had to undergo a progressive decondensation during post-embryonic development to establish its

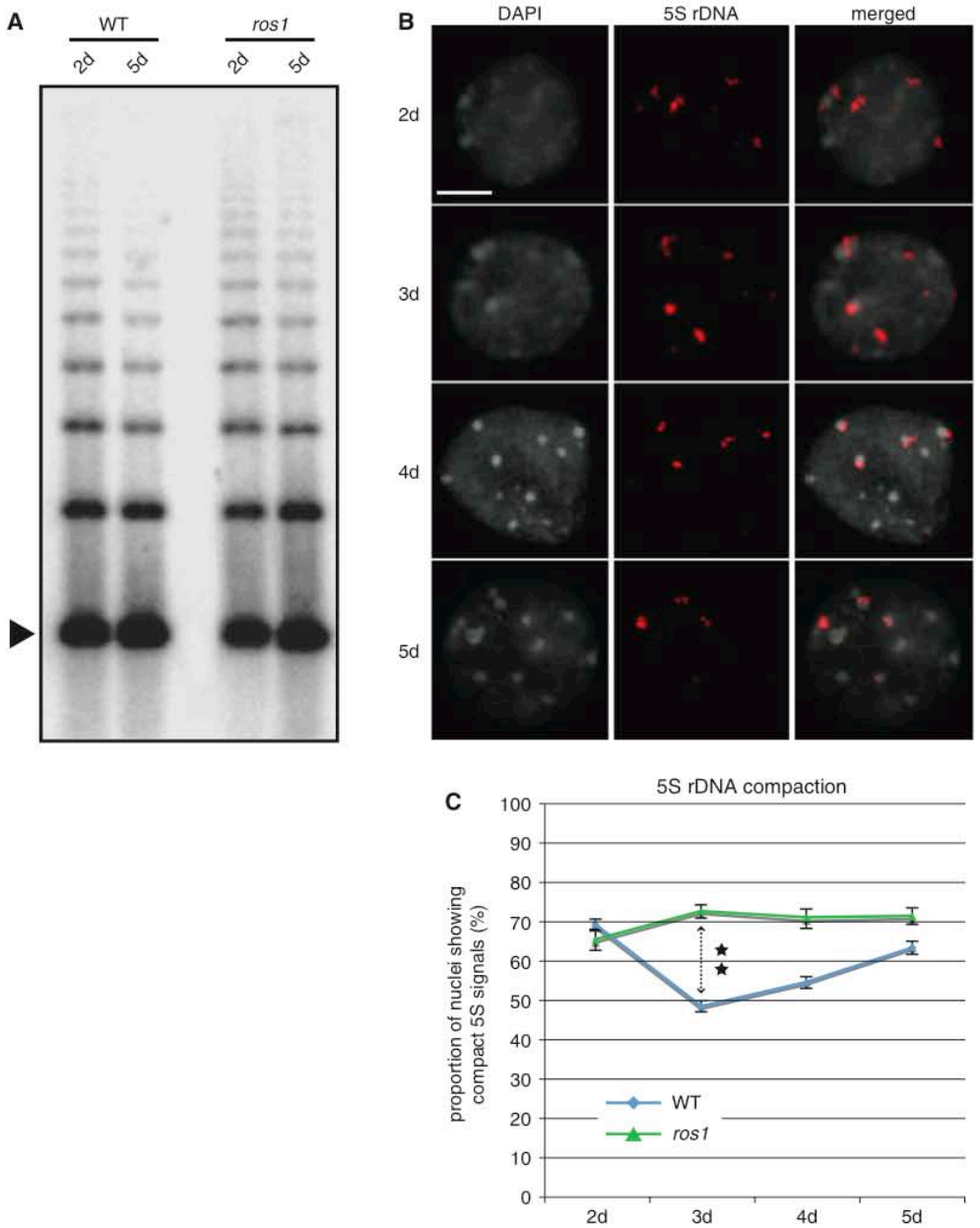


Fig. 4 ROS1 mediates 5S rDNA demethylation. (A) Genomic DNA (300 ng) of WT and *ros1* plants was digested with *Hae*III. The DNA gel-blot was probed with 5S rDNA. Digestions were performed from plants at 2 and 5 d post-germination. The arrowhead shows a 0.5 kb 5S rDNA unit. (B) Counterstaining with DAPI (left); FISH with a 5S rDNA probe (middle); and the merge of both (right) on nuclei from *ros1* plants at 2, 3, 4 and 5 d post-germination. Bar = 5 µm. (C) Proportion (%) of WT and *ros1* nuclei harboring compact 5S signals at different times of development. Nuclei with a maximum of one diffuse 5S rDNA signal were considered as compact, whereas nuclei with at least two diffuse 5S signals were considered as decompacted. A compact signal is a punctate signal. For each stage, between 50 and 90 nuclei were observed. The confidence interval is indicated for each value. Asterisks ($^{**}P<0.01$; one-tailed Z-test) indicate a significant difference between the WT and *ros1* values. The confidence interval is indicated for each value.

mature organization (i.e. part of the 5S rDNA is located within heterochromatic CCs whereas the other fraction forms loops with euchromatic features, considered to contain the transcribed 5S genes, that emanate from CCs) (Mathieu et al. 2003). Surprisingly, FISH results showed that, starting from 2-day-old nuclei, a large and rapid 5S rDNA chromatin decondensation occurs, which precedes a 're'condensation of a 5S rDNA fraction to obtain almost mature nuclei 5 d post-germination. In this study, we provide evidence that ROS1 is responsible for the decondensation event and Pol IV is necessary for the reorganization phenomenon. We observed the same decondensation event between 2 and 3 d post-germination in WT and *nrpd2a* plants. However, the difference between them became obvious at 4 d post-germination. The absence of 're'condensation of 5S rDNA in the *nrpd2a* mutant clearly demonstrates the role of Pol IV in the establishment of the 5S rDNA heterochromatin fraction during early development.

Several publications demonstrated a correlation between the formation of pericentromeric heterochromatin and cell differentiation during mammalian early development (Cammas et al. 2002, Rangasamy et al. 2003, Probst et al. 2007, Puschendorf et al. 2008). For example, the first rearrangement of the pericentromeric heterochromatin into somatic CCs takes place at the 2-cell stage in the mouse. According to Probst and Almouzni (2007), this 2-cell stage might be the first opportunity to express an RNA component that could contribute to CC organization. In *Arabidopsis thaliana*, the two plant-specific nuclear Pol IV forms, Pol IVa and Pol IVb (Herr et al. 2005, Kanno et al. 2005, Pontier et al. 2005, Vaucheret 2005), mediate siRNA- and DNA methylation-dependent heterochromatin formation (Onodera et al. 2005).

In the same window of time (i.e. 2–5 d post-germination), we noticed changes in the methylation pattern of 5S rDNA in WT plants. We observed a faint increase of 5S rDNA methylation at symmetrical sites in accordance with Mathieu et al. (2003). We also observed a marked decrease of methylation at asymmetrical cytosines mediated by the demethylase ROS1. Most of the loci affected by *ros1* are affected in non-CG contexts (Zhu et al. 2007). The observed absence of asymmetrical demethylation in *nrpd2a* mutant results from the down-regulation of *ROS1* in the *pol IV* mutant (Huettel et al. 2006, Mathieu et al. 2007). 5S rDNA is strongly methylated in the seed (Mathieu et al. 2003) and at 2 d post-germination (this work) in WT plants. In *nrpd2a* plants, the 5S rDNA methylation is lower compared with WT plants whatever the methylation context or the age of the plants, confirming the role of Pol IV in the 5S rDNA methylation. The lower methylation of 5S rDNA in *nrpd2a* plants compared with WT plants 2 days post-germination suggests that Pol IV activities are already needed during seed formation. Accordingly, Pontier et al. (2005) reported a very abundant accumulation of NRPD1a and NRPD1b proteins, two Pol IV subunits, in the reproductive phase (flowers) compared with the vegetative phase (leaves). However, 5S rDNA compaction is not affected in 2-day-old *nrpd2a* nuclei. This shows that mechanisms other than methylation are involved in DNA compaction in the quiescent seed. Seeds are characterized by a high degree of dehydration known to play a significant role in DNA conformational structures (Zluvova et al. 2001).

Maturation of (hetero)chromatin goes through the presence of heterochromatic foci which disappear in mature WT nuclei but remain in *nrpd2a* nuclei. *nrpd2a* nuclei retain at least two characteristics of immature nuclei: the decompaction of pericentromeric sequences such as 5S rDNA and the maintenance of heterochromatic foci. Although ROS1, together with Pol IV, participates in the maturation of the 5S rDNA chromatin, maturation of the transient heterochromatic foci does not seem to depend on ROS1.

Nuclear reorganization should be considered as an important driving force in the regulation of developmental gene expression. During early mammalian development, chromatin remodeling and, hence, nuclear reorganization is thought to be functionally linked to transcriptional activation during embryo pre-implantation (De La Fuente et al. 2004, Martin et al. 2006). In plants, conformational changes of DNA (Boubriak and Osborne 1994) and large global demethylation events (Drozdenyuk and Vanyushin 1976, Follmann and Schleicher 1990) take place during germination and obviously reflect a transition from the metabolically quiescent seed to the actively growing and developing seed (Zluvova et al. 2001). In the *Arabidopsis suecica* allotetraploid hybrid, changes in NOR condensation and chromatin modifications correlate with changes in 45S rDNA gene expression during post-germination early development (Pontes et al. 2007).

In conclusion, we have shown that ROS1 and Pol IV act together to remodel the 5S chromatin via DNA methylation modifications. The viability of *ros1* plants shows that 5S RNA transcription can occur without the major 5S rDNA chromatin decondensation event. We cannot exclude that *ros1* mutant has developed alternative pathways to ensure an appropriate ribosome production (a situation encountered several times; Vaillant et al. 2007, Vaillant et al. 2008), or that these remodeling events facilitate an efficient transcription. However, according to Matzke et al. (2007), the elaboration of the Pol IV pathway in the plant kingdom might reflect the need for rapid, reversible changes in gene expression. Thus it is reasonable to think that in the WT context, the decondensation might allow unlocking of a fraction of 5S rDNA units able to respond to environmental changes. In this case, the 5S rDNA cytological difference in *ros1* and WT 5-day-old nuclei is expected to

be subtle. The Pol IV/ROS pathway might control a fraction of the 5S rRNA genes, i.e. the plastic 5S rDNA fraction.

Materials and Methods

Plant material

Arabidopsis thaliana WT, *pol IV* (*nrpd2a-1*) and *ros1-1* plants were from the Columbia ecotype. *nrpd2a-1* seeds were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (Stock # SALK 095689) and *ros1-1* seeds were obtained from Dr. J. K. Zhu (University of California, Riverside, California, USA). After synchronization for 2 d at 4°C, seeds were grown on a germination medium [MS Salt (Duchefa biochimie, Haarlem, The Netherlands) supplemented with 3% sucrose and 0.8% BactoAgar] in a growth chamber using a 16 h light (120 μE m^{-2} s^{-1})/8 h dark regime at 23°C, and cotyledons (first leaves developed during embryogenesis) were collected at 2–5 d post-germination.

Nucleic acid isolation and gel-blot analysis

Total genomic DNA was isolated using the DNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Digestions were realized with 300 ng of Arabidopsis genomic DNA and 20 U of restriction enzyme in the recommended buffer (New England Biolabs, UK). Digested DNA was electrophoresed in 0.8% agarose gels overnight, depurinated in 0.25 N HCl and capillary blotted onto Hybond-N+ membranes (Amersham, GE Healthcare, Saclay, France).

DNA probes were labeled with [α-^{32}P]dCTP using a random hexamer priming method (Megaprime DNA labelling system, Amersham). Quantifications were done on a PhosphorImager (Molecular Imager FX, Bio-Rad). For quantification of 5S rDNA methylation, the radioactivity of the 0.5 kb band (which corresponds to monomeric units of 5S rDNA) was compared with the radioactivity of the whole lane.

Fluorescent in situ hybridization

Prior to use, tissues were fixed in ethanol/acetic (3 : 1) solution. Probes were labeled by PCR using gene-specific primers with biotin-16-UTP (Roche, Meylan, France) or digoxigenin-11-UTP (Roche). FISH experiments were performed according to Schubert et al. (2001). When biotin-labeled probes (5S rDNA or 5S rDNA mixed with 180 bp repeats) were used, avidin conjugated with Texas Red (1 : 500; (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1 : 100; Vector Laboratories) and avidin–Texas Red (1 : 500) were used for the detection. When biotin-labeled (5S rDNA mixed with 180 bp repeats) and digoxigenin-labeled (45S rDNA) probes were used together, avidin–Texas Red (1 : 500) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1 : 100) and avidin–Texas Red (1 : 500) were used for the detection of the biotin-labeled probe, and mouse anti-digoxigenin (1 : 125; Roche) followed by rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (1 : 500; Sigma) and Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) were used for the detection of the digoxigenin-labeled probe. Before microscopic analysis, nuclei were stained with DAPI.

Microscopy and image processing

For microscopic analysis, an epifluorescence Imager Z1 microscope (Zeiss) with an Axiocam MRm camera (Zeiss) was used. Fluorescence images for each fluorochrome were captured separately through the appropriate excitation filters. The images were pseudocolored, merged and processed with the Adobe Photoshop software (Adobe Systems). Between 50 and 90 nuclei were analyzed for each developmental stage.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on cytological results for 5S rDNA compaction and s-foci. In both cases a comparison of proportions Z-test was used. The probabilities were calculated from a one-tailed test. The confidence interval was calculated for each proportion with a confidence level of 99%. Between 50 and 90 nuclei were analyzed for each developmental stage.

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Blaise Pascal; the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI/BCMS); the Auvergne region; the Institut National du Cancer (INCA, réseau Epipro); the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (fellowship to J.D.).

Acknowledgments

We thank J. K. Zhu for providing seeds of the *ros1* mutant, B. Laubin for technical assistance, I. Jouan for statistical analysis, and A. V. Probst for critical reading of the manuscript.

References

Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 11796–11801.

Boubriak, I.I. and Osborne, D.J. (1994) DNA and dessication tolerance. *Seed Sci. Res.* 4: 175–185.

Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22: 268–280.

Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P. and Losson, R. (2002) Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J. Cell Sci.* 115: 3439–3448.

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.

De La Fuente, R., Viveiros, M.M., Wigglesworth, K. and Eppig, J.J. (2004) ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Dev. Biol.* 272: 1–14.

Drozdenyuk, A.P. and Vanyushin, B.I. (1976) Changes in base composition and molecular population of wheat DNA on germination. *Mol. Biol.* 10: 1378–1386.

Follmann, B.H. and Schleicher, R. (1990) Biosynthesis and distribution of methylcytosine in wheat DNA. How different are plant DNA methyltransferases?. *In* Nucleic Acid Methylation. Edited by Clawson, G., Willis, D., Weissbach, A. and Jones, P. pp. 199–209. A. R. Liss Inc., New York.

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.F. and de Jong, J.H. (2002) Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 560–567.

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111: 803–814.

Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8: 35–46.

Haupt, W., Fischer, T.C., Winderl, S., Fransz, P. and Torres-Ruiz, R.A. (2001) The centromere1 (CEN1) region of Arabidopsis thaliana: architecture and functional impact of chromatin. *Plant J.* 27: 285–296.

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., Aufsatz, W., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2006) Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *EMBO J.* 25: 2828–2836.

Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., et al. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19: 489–501.

Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., et al. (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* 37: 761–765.

Kapoor, A., Agius, F. and Zhu, J.K. (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* 579: 5889–5898.

Keohane, A.M., O'Neill, L.P., Belyaev, N.D., Lavender, J.S. and Turner, B.M. (1996) X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 180: 618–630.

Kobayakawa, S., Miike, K., Nakao, M. and Abe, K. (2007) Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 12: 447–460.

Madlung, A. and Comai, L. (2004) The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann. Bot.* 94: 481–495.

Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., Quivy, J.P., Roche, D., Taddei, A., et al. (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet* 30: 329–334.

Martin, C., Beaujean, N., Brochard, V., Audouard, C., Zink, D. and Debey, P. (2006) Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev. Biol.* 292: 317–332.

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

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.

Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. and Matzke, A.J. (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 512–519.

McClelland, M., Nelson, M. and Raschke, E. (1994) Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22: 3640–3659.

Murata, M., Heslop-Harrison, J.S. and Motoyoshi, F. (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.

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.

Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R. and Roldán-Arjona, T. (2008) Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biol.* 67: 671–681.

Pelissier, T., Tutois, S., Deragon, J.M., Tourmente, S., Genestier, S. and Picard, G. (1995) Athila, a new retroelement from Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 29: 441–452.

Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. and Fischer, R.L. (2007) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 6752–6757.

Pikaard, C.S. (2006) Cell biology of the Arabidopsis nuclear siRNA pathway for RNA-directed chromatin modification. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 71: 473–480.

Pontes, O., Lawrence, R.J., Silva, M., Preuss, S., Costa-Nunes, P., Earley, K., et al. (2007) Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar dominance. *PLoS ONE* 2: e1157.

Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., 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.

Probst, A.V. and Almouzni, G. (2007) Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation* 76: 15–23.

Probst, A.V., Santos, F., Reik, W., Almouzni, G. and Dean, W. (2007) Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma* 116: 403–415.

Puschendorf, M., Terranova, R., Boutsma, E., Mao, X., Isono, K., et al. (2008) PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat. Genet.* 40: 411–420.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. and Tremethick, D.J. (2003) Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.* 22: 1599–1607.

Schubert, I., Fransz, P.F., Fuchs, J. and de Jong, J.H. (2001) Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci.* 23: 57–69.

Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (2000) Endogenous targets of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1165–1178.

Tutois, S., Cloix, C., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Lafleuriel, J., Picard, G., et al. (1999) Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of Arabidopsis thaliana. *Chromosome Res.* 7: 143–156.

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.

Vaucheret, H. (2005) RNA polymerase IV and transcriptional silencing. *Nat. Genet.* 37: 659–660.

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. USA* 104: 4536–4541.

Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, V.V., Agius, F. and Zhu, J.K. (2007) The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 17: 54–59.

Zluvova, J., Janousek, B. and Vyskot, B. (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J. Exp. Bot.* 52: 2265–2273.

(Received September 13, 2008; Accepted October 7, 2008)

SUPPLEMENTAL DATA

MATERIALS AND METHODS

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Prior to use, tissues were fixed in ethanol/acetic (3:1) solution. Probes, excepted BACS (see below), were labeled by PCR using gene specific primers with biotin-16-UTP (Roche) or digoxigenin-11-UTP (Roche). FISH experiments were performed according to Schubert et al. (2001). When biotin-labeled probes (5S rDNA or 5S rDNA mixed with 180bp-repeats) were used, avidin conjugated with Texas Red (1:500; Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100; Vector Laboratories) and avidin–Texas Red (1:500) were used for the detection. Digoxigenin-labeled (*TSI*, *ATHILA*, BACs) and biotin-labeled (5S rDNA mixed with 180bp-repeats) probes were used together, avidin conjugated with Texas Red (1:500; Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100; Vector Laboratories) and avidin–Texas Red (1:500) were used for the detection of the biotin-labeled probe; and mouse anti-digoxigenin (1:125; Roche) followed by rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500; Sigma) and Alexa 488-conjugated goat-anti-rabbit (Molecular Probes) were used for the detection of the digoxigenin-labeled probe. Before microscopic analysis, nuclei were stained with DAPI (4’, 6-diamidino-2-phenylindole).

BACs F14F8, F17K4, F1N13, F2K13, F20L16, F5E19, F7K24, MIKP11, MIQK4, MIRG7, MIVA3, T16G12, T1A4, T21H19, T29J13 were labeled with digoxigenin-11-dUTP using the nick translation kit (Roche).

Article n°3 :

« Pol IVb has a preponderant role on 5S rDNA array from chromosome 4 in Arabidopsis»

Julien Douet, Sylvie Tutois and Sylvette Tourmente

Dans l'article précédent, nous avons vu que des remaniements importants de la chromatine, impliquant la participation de l'ARN polymérase IV, surviennent durant les premières étapes du développement. L'ARN polymérase IV étant très active sur l'ADNr 5S durant cette période, nous disposions d'un outil performant pour préciser son rôle dans l'établissement des patrons d'expression et des structures chromatiniennes des gènes d'ARNr 5S. Nous avons notamment cherché à comprendre les rôles respectifs des formes Pol IVa et Pol IVb.

Précédemment, des travaux menés dans l'équipe avaient permis la détection d'un transcrit ARNr 5S atypique, d'une longueur de 210 bases (5S-210), dont l'expression était activée dans les mutants comme *met1* ou *ddm1* (Vaillant et al., 2006). Le 5S-210 a donc été considéré et utilisé comme un témoin de dérépression des gènes d'ARNr 5S.

Dans l'article précédent, nous avons vu que l'ARN polymérase IV est impliquée dans la phase de recondensation de l'ADNr 5S, cependant, son éventuel rôle dans la répression transcriptionnelle d'une fraction des gènes d'ARNr 5S restait inconnu. L'analyse semi-quantitative des transcrits 5S-210 par RT-PCR associée au séquençage des produits PCR nous a indiqué que l'ARN polymérase IV exerce une répression sur l'expression des gènes d'ARNr 5S selon un mode d'action inattendu. En effet, alors que Pol IVa et Pol IVb semblent coopérer pour maintenir le « silencing » des loci 5S des chromosomes 4 et 5, Pol IVb possède une activité répressive supplémentaire uniquement dédiée au bloc 5S du chromosome 4 et indépendante de Pol IVa et de RDR2. Ceci a été confirmé par des expériences de FISH qui indiquent que seul le locus 5S du chromosome 4 subit une décondensation dans les mutants *pol IVb* (*nrpd1b*) et *pol IV* (*nrpd2a*) mais qui est absente du mutant *pol IVa* (*nrpd1a*).

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la nature du transcrit 5S-210 qui possède dans sa séquence de l'homologie avec le siRNA 1003, lui-même connu pour cibler les gènes d'ARNr 5S. Grâce à des expériences de RT-PCR, nous avons pu mettre en évidence des orientations sens et antisens pour le 5S-210, suggérant donc une organisation en ARN double brin,. Nous avons pu également montrer que RDR2 est responsable de la synthèse du brin antisens et que son action est indépendante et antérieure à celle de Pol IVa.

Nos résultats suggèrent deux voies distinctes pour la régulation des gènes d'ARNr 5S. Une première voie serait basée sur la coopération de Pol IVa et Pol IVb pour imposer le « silencing » transcriptionnel des loci 5S des chromosomes 4 et 5. Cette action pourrait passer par la génération de siRNA à partir des transcrits 5S-210 double brin produits par RDR2. Une deuxième voie, indépendante de Pol IVa et RDR2, impliquerait Pol IVb dans le remaniement de la chromatine du bloc d'ADNr 5S du chromosome 4.

Pol IVb has a preponderant role on 5S rDNA array from chromosome 4 in Arabidopsis.

Julien Douet, Sylvie Tutois and Sylvette Tourmente*

CNRS, UMR 6247 GReD; Clermont Université; INSERM; 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France

*Corresponding author: Sylvette Tourmente

Address: UMR GReD, CNRS, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France
Tel: (33) 4 73 40 74 01
FAX: (33) 4 73 40 77 77

ABSTRACT

In this paper, we have studied the expression of the 5S-210 transcript, a marker of silencing release at 5S RNA genes, to show a differential impact of RNA polymerase IV (Pol IV) on 5S rDNA arrays. We have shown that Pol IVa and Pol IVb cooperate to maintain a transcriptional silencing of 5S RNA genes at chromosomes 4 and 5. We also showed an additional Pol IVb activity, RDR2- and Pol IVa-independent which occurs specifically on 5S RNA genes from chromosome 4. It is illustrated by a large silencing release correlated to the decompaction of 5S rDNA at chromosome 4 in *pol IVb* mutant. Contrary to the current RNA-directed DNA methylation (RdDM) models, RDR2 acts upstream of Pol IVa at 5S RNA genes. It generates a 5S-210 antisens transcript, 210 bases-long, from the complementary sens transcript whose initial transcription is Pol IV-independent. The long 5S-210 double-stranded RNA very likely produces the wellknown 24 nt-heterochromatic 5S siRNA used as a marker of RdDM at 5S RNA genes. In conclusion, our results are in agreement with the two-step RdDM model proposed by Matzke et al. (2006) together with an additional Pol IVb activity.

Key words : Pol IV, 5S RNA gene silencing, 5S-210 transcript, chromatin compaction, RDR2.

INTRODUCTION

Plant gene silencing is targeted to transposons and repeated sequences by small RNAs from the RNA interference (RNAi) pathway. The plant-specific RNA polymerase IV (Pol IV) has been recently reported to contribute to siRNA production and shown to be essential to RNA-directed DNA methylation (RdDM) (Herr et al., 2005 ; Kanno et al., 2005; Onodera et al., 2005 ; Pontier et al., 2005). RdDM is the prominent nuclear silencing pathway presumed to guide formation of transcriptionally silent heterochromatin at repeated loci (Brodersen and Voinnet, 2006). High levels of DNA methylation and silencing depend on siRNA accumulated by the Pol IV pathway. Pol IV exists in two isoforms (Pol IVa and Pol IVb) with NRPD1a and NRPD1b as their respective largest subunits. Both Pol IVa and Pol IVb share the second largest subunit NRPD2a. Pol IVa and Pol IVb act at different steps in the RdDM pathway, but their precise role remains unknown. Genes involved in the production of siRNAs associated with DNA methylation include NRPD1a, RDR2 (RNA-Dependent RNA Polymerase 2), and DCL3 (DICER-LIKE 3). Previous models for the RdDM pathway have suggested that Pol IVa transcribes methylated DNA or transcripts of methylated loci, with resulting Pol IVa transcripts being made double-stranded by RDR2. However, no template and product were experimentaly demonstrated neither for Pol IVa nor for RDR2. Then, double-stranded RNAs are thought to be processed onto 24nt siRNAs by DCL3. (Kanno et al., 2005; Herr et al., 2005; Xie et al., 2004; Chan et al., 2004). Downstream genes which carry out the transcriptional silencing function include AGO4 (Argonaute 4) which binds siRNAs, DRD1, a SWI/SNF family protein, and NRPD1b (Zilberman et al., 2003; Onodera et al., 2005; Pikaard et al., 2008). NRPD1b interacts with AGO4 through the CTD (Li et al., 2006; El-Shami et al., 2007), and Pol IVb, DRD1 and DRM2 (Domains Rearranged Methylase 2) (Chan et al., 2004; Cao and Jacobsen, 2002) are then thought to collaborate in the siRISC-directed DNA methylation process. Recent genome wide analyses of small RNA populations have shown that there are at least 4600 Arabidopsis loci that give rise to small RNAs, with 94% of them being dependent on Pol IVa, and with a Pol IVb contribution depending on the loci (Mosher et al., 2008).

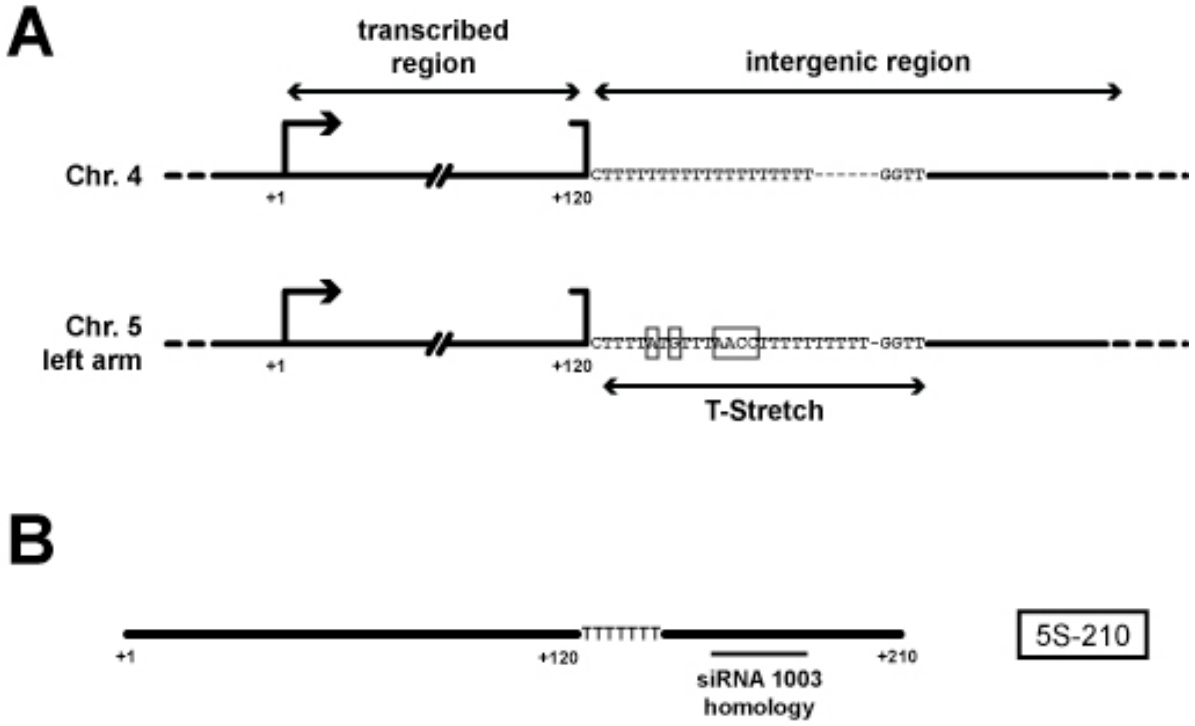


Figure 1 : Schematic representation of a 5S rDNA unit and 5S-210 transcript.

A) A 5S rDNA unit contains the 120bp-transcribed region followed by the intergenic region containing the 5S array-specific T-stretch. Boxes represent differences between the two T-stretch from chromosome 4 and chromosome 5 left arm.

B) The 5S-210 transcript is homologous to the 120nt-transcribed region and 90nt from the adjacent intergenic region. T-stretch and siRNA 1003 are shown.

Targets of the Pol IV-dependent RdDM include transposable elements, regulatory regions of several protein-coding genes and 5S rRNA-encoding DNA (rDNA) arrays (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Chan et al., 2006; Pontier et al., 2005; Qi et al., 2006; Zilberman et al., 2003; Zilberman et al., 2004; Onodera et al., 2005; Xie et al., 2004). We (Douet et al., 2008) and others (Onodera et al., 2005; Elmayan et al., 2005; Pontier et al., 2005; Pontes et al., 2006) have reported changes in 5S rDNA methylation, 5S rDNA chromatin compaction and 5S siRNA accumulation in *Pol IV* mutants. In these reports, 5S rDNA arrays, which have separate functions and locations (For a review, Douet and Tourmente, 2007), were considered together.

Arabidopsis thaliana contains approximately 1000 copies of 5S rRNA genes per haploid genome. 5S rDNA is arranged in tandem arrays (Campell et al., 1992) and located within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of chromosome 5) in the Columbia accession (Fransz et al., 1998; Murata et al., 1997). The 5S array from chromosome 3 and the small locus on the right arm of chromosome 5 are transcriptionally inactive due to the presence of mutations in the promoter of the 5S RNA genes. 5S-repeat clusters located on chromosomes 4 and left arm of chromosome 5 are transcriptionally active (Cloix et al., 2002). They both contain transcribed and repressed/heterogenous 5S RNA genes in WT plants (Mathieu et al., 2003). We have previously identified a 5S RNA species (5S-210) composed of genic and intergenic regions which is a marker of silencing release at 5S RNA genes (Vaillant et al., 2006). The presence of a chromosome-specific T stretch identifies the chromosome origin of 5S-210 transcripts (Cloix et al., 2002).

In this paper, we have shown that Pol IVa and Pol IVb cooperate to maintain a transcriptional silencing of 5S RNA genes at chromosomes 4 and 5. We also showed an additional Pol IVb activity, RDR2- and Pol IVa-independent, which occurs specifically on 5S RNA genes from chromosome 4. We also identified a RDR2 substrate since 5S-210 RNAs are made double-stranded by the RDR2 activity. Our results on 5S rDNA are in favor of RDR2 acting upstream of Pol IVa and support the two-step RdDM model proposed by Matzke et al. (2006) together with an additional Pol IVb activity.

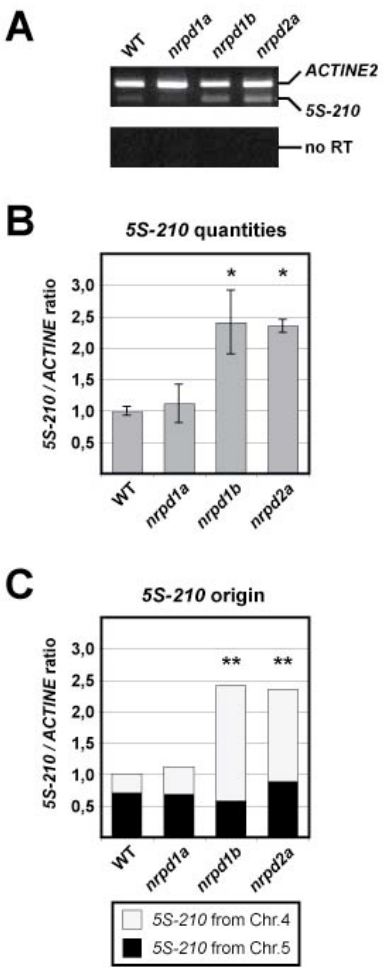


Figure 2 : RT-PCR detection of *5S-210* transcripts in WT, *nrpd1a*, *nrpd1b*, *nrpd2a* mutant plants.

(A) Expression of *ACTIN 2* was used to normalize the *5S-210* amounts. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT).

(B) A graphic representation of 5 independent experiments is given. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. Asterisks indicate values significantly different from the WT value which is arbitrarily fixed as 1 (Mann-Whitney test, * $P<0.05$).

(C) Proportion of 5S-210 transcripts from chromosomes 4 and 5. RT-PCR products from (B) were sequenced and the T stretch signature analysed to determine the 5S-array' origin of 5S-210 transcripts.

A total of 70, 53, 68 and 51 5S-210 cDNA clones were sequenced for WT, *nrpd1a*, *nrpd1b*, and *nrpd2a*, respectively. Asterisks denote significant differences to the WT value (Fisher's exact test, ** $P<0.001$) which is arbitrarily fixed as 1.

RESULTS

Different impact of Pol IVa and Pol IVb in 5S RNA genes silencing

In a preceding paper, we have identified a 5S transcript, 210 bases-long (5S-210) which is a marker of silencing release at 5S RNA genes**.** This 5S-210 transcript homologous to the 120nt-transcribed region and 90nt from the adjacent intergenic region (Vaillant et al., 2006) contains the sequence of the chromosome-specific T stretch which identifies its 5S array- origin, and the sequence of the wellknown 5S siRNA 1003 (Figure 1). The accumulation of this 24nt-siRNA is used to test the action of RdDM proteins on 5S rDNA.

In order to define the impact of the Pol IV isoforms on 5S RNA genes silencing, we analysed 5S-210 accumulation by RT-PCR experiments in WT, *nrpd1a* (mutant of the largest subunit of Pol IVa), *nrpd1b* (mutant of the largest subunit of Pol IVb) and *nrpd2a* (mutant of the common subunit of Pol IVa and b) plants. 5S-210 transcripts overaccumulated by a 2,5 factor in *nrpd1b* and *nrpd2a* but not in *nrpd1a* accumulating similar 5S-210 transcripts quantities than WT plants (Figure 2A, B).

The release of silencing in *nrpd1b* indicates that silencing of 5S RNA genes is controlled by Pol IVb. and the results obtained with *nrpd2a* confirm these observations.

The absence of silencing release in *nrpd1a* shows that Pol IVa has no influence, at the quantitative level, on 5S-210 RNA transcription.

Pol IVb has a preponderant role on 5S array from chromosome 4

5S rDNA arrays are located within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5. We assessed whether this Pol IV-mediated silencing operates on all 5S arrays or operates selectively. Using the T stretch signature (Cloix et al., 2002), we analysed the origin of the 5S-210 transcripts. Sequencing of RT-PCR products revealed that 5S-210 transcripts only originate from the transcriptionally active 5S-repeat clusters located on chromosomes 4 and chromosome 5 left arm. In WT conditions, the 5S array from chromosome 5 contributes for 70%, the 5S array from chromosome 4 contributing for the remaining

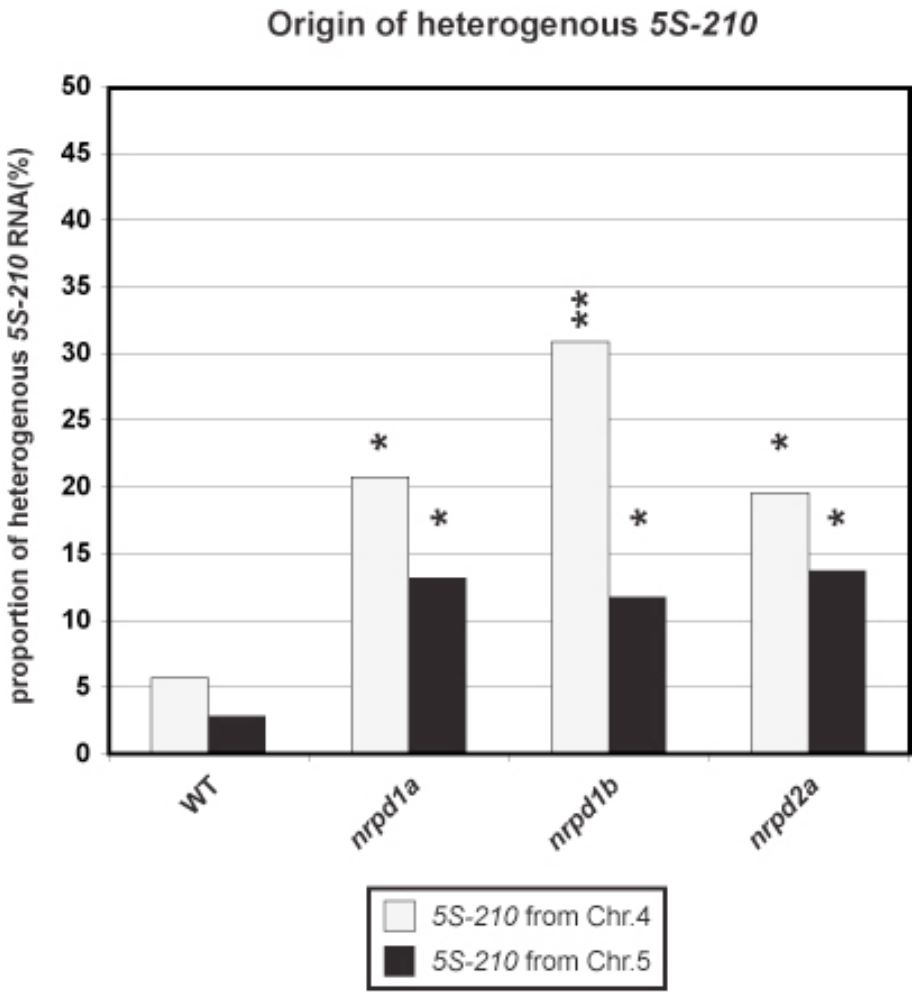


Figure 3 : Proportion of heterogenous 5S-210 transcripts from chromosomes 4 and 5 The 70, 53, 68 and 51 5S-210 cDNA clones from WT, *nrpd1a*, *nrpd1b*, and *nrpd2a* plants respectively, were analyzed for the presence of nucleotide substitutions (heterogeneity) in the first 120 bp of their sequence. (Alignment is provided figure S1).

Asterisks denote significant differences to the corresponding (chromosome 4 or 5) WT reference value (Fisher's exact test, * P<0.05, ** P<0.01). The proportions obtained for chromosome 4 in *nrpd1b* are not significantly different from nrpd1a (P=0,15).

30% of the 5S transcripts (Figure 2C). The proportions and quantities are not significantly different in *nrpd1a* mutant compared to WT. In *nrpd1b* and *nrpd2a* mutants, the 2,5 factor overaccumulation of 5S-210 transcripts results only from the silencing release of the 5S array from chromosome 4, since the quantity of 5S-210 transcripts providing from chromosome 5 is unchanged (Figure 2C).

These results refine our previous conclusions indicating that the silencing release observed in *nrpd1b* concerns the 5S array from chromosome 4 ; the results obtained with *nrpd2a* confirm these observations. Therefore, the Pol IVb-mediated repression seems to operate majorily on the 5S array from chromosome 4.

Differential Pol IV regulation on 5S arrays from chromosomes 4 and 5

The 5S rDNA loci consist of both active and heterogenous silent copies of the 5S RNA gene. We previously showed that the release of silencing of 5S RNA genes illustrated by the increase of the proportion of heterogenous 5S transcripts (i.e. containing some mutations in the transcribed region) can occur without changes of the 5S RNAs quantity (Mathieu et al., 2003; Vaillant et al., 2007). Our present results unequivocally show the Pol IVb impact on chromosome 4 since we observed an overaccumulation of 5S-210 transcripts from this chromosome in the *pol IVb* mutant. However, we cannot exclude some effect of Pol IVa on this 5S array, as well as we cannot exclude some effect on transcription of Pol IVa and Pol IVb on the 5S array from chromosome 5 at the qualitative level. To precise the relations Pol IV isoforms/ 5S arrays, we have analysed the heterogeneity of 5S-210 transcripts produced by 5S arrays from chromosomes 4 and 5 (Figure 3). As shown figure 3, the proportion of heterogenous 5S RNA increases in each mutant.

First, the results show that the proportion of heterogenous 5S RNA from chromosome 5 is significantly enhanced in the same proportions in *nrpd1a*, *nrpd1b* and *nrpd2a* compared to the 3% observed in WT. They demonstrate the Pol IV impact on this 5S array with an equivalent impact of Pol IVa and Pol IVb.

Second, for chromosome 4 we can observe a significant increase of the proportion of heterogenous 5S transcripts in *nrpd1a* compared to WT. Less surprisingly, in *nrpd1b and nrpd2a* we observed a significant increase of the proportion of heterogenous 5S transcripts, compared to WT (Figure 3).

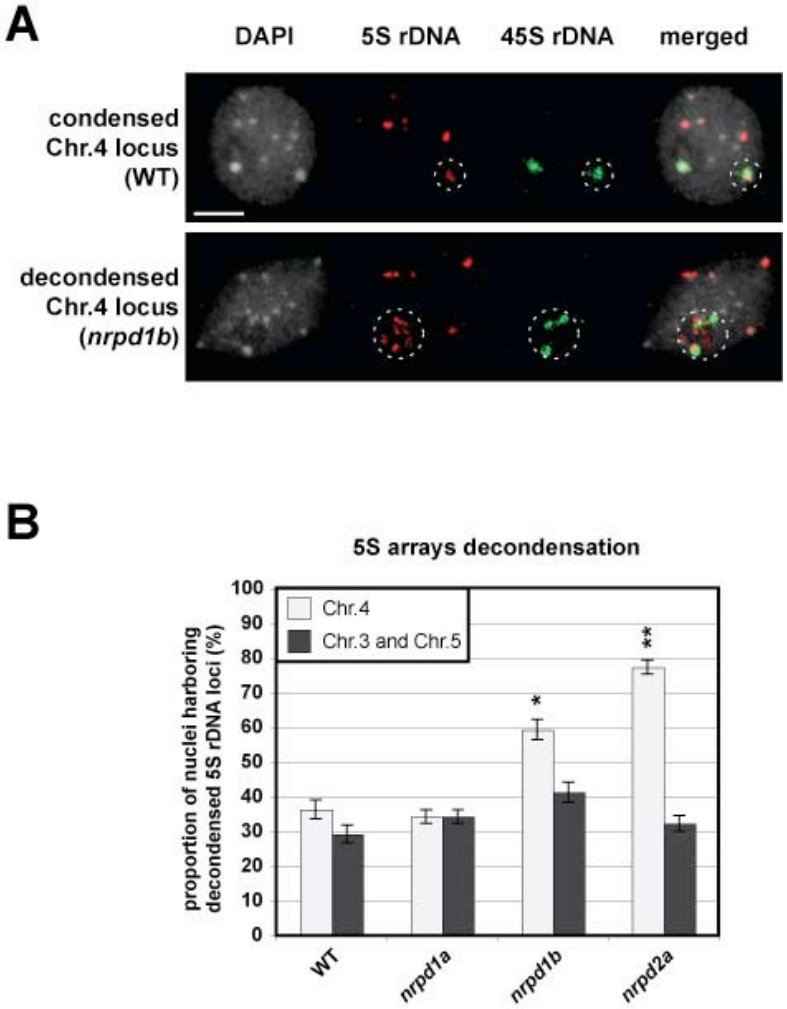


Figure 4 : Compaction of 5S arrays from chromosomes 3, 4 and 5.

A) Representative images of condensed and decondensed 5S rDNA locus from chromosome 4. Counterstaining with DAPI (left); FISH with a 5S rDNA probe (red); FISH with a 25S rDNA probe which reveals the 45S locus (green); and the merged image on nuclei from WT and *nrpd1b* nuclei. Associated 5S and 45S rDNA loci from chromosome 4 are circled. In both cases (WT and *nrpd1b*), 5S signals from the two chromosomes 4 are present in the white circle. Non circled 5S-red signals are from chromosomes 3 and 5. Bar = 5 µm.

B) Proportion of nuclei, derived from 45 to 62 nuclei analysed, harboring decondensed 5S signals. 5S signals from chromosome 4 were analysed separately whereas 5S signals from chromosomes 3 and 5 were considered together.

Asterisks denote significant differences to the corresponding (chromosome 4 or 3 and 5) WT value. (Z-test , * P< 0,05 , ** P< 0,01). Interval confidence with a confidence level of 99% is shown on each bar.

These results refine our previous conclusions indicating that silencing of 5S RNA genes from chromosome 5 is controlled by Pol IVa and b at the qualitative level ; both isoforms seem to have an equivalent effect *i.e.* a derepression of heterogenous 5S genes is observed in *nrpd1a* and *nrpd1b* without increasing the total amount of 5S-210 RNA. Silencing of 5S RNA genes from chromosome 4 is controlled by Pol IVa at the qualitative level, and Pol IVb exerts a major role acting at both qualitative and quantitative levels.

The results suggest that Pol IVa and Pol IVb act in the same pathway to maintain the repression of heterogenous 5S genes from chomosome 5. They also suggest a specific and additionnal role for Pol IVb on 5S arrays from chromosomes 4. There is therefore a differential Pol IV impact on 5S arrays from chromosomes 4 and 5.

Pol IVb drives compaction of 5S rDNA from chromosome 4

RdDM drives DNA methylation and chromatin compaction at Arabidopsis pericentromeric sequences such as 5S rDNA (Pikaard, 2006; Mathieu et al., 2007). The phenotypes observed in *pol IV* mutant nuclei revealed that 5S RNA genes are typically decondensed, hypomethylated and show significantly less colocalization with heterochromatic centromeres. However 5S arrays from the different chromosomes were not discriminated (Onodera et al., 2005; Douet et al., 2008).

In order to determine whether chromatin decompaction is 5S array-specific or may concern every 5S array, we performed FISH experiments with both 5S rDNA and 45S rDNA probes on WT and *Pol IV* mutant plants. The chromosome 4 is the only chromosome to carry both rDNA species. 5S rDNA from chromosome 4 colocalizes with 45S rDNA signals in almost all nuclei (Fransz et al., 2002). 5S signals outside chromosome 4, coming from chromosomes 3 and 5 were considered together (Figure 4).

FISH analysis revealed that 36 % of the WT nuclei contain one or two decondensed 5S signals at chromosome 4. The proportions are similar in WT and *nrpd1a* mutant whereas a significant larger proportion (59%) of the *nrpd1b* and (77%) of *nrpd2a* nuclei harbor decondensed 5S signals at chromosome 4. From these analyses, we conclude that 5S arrays from chromosome 4 are decondensed in *nrpd1b*, and these results are confirmed with *nrpd2a* observations, whereas *nrpd1a* has no visible effect

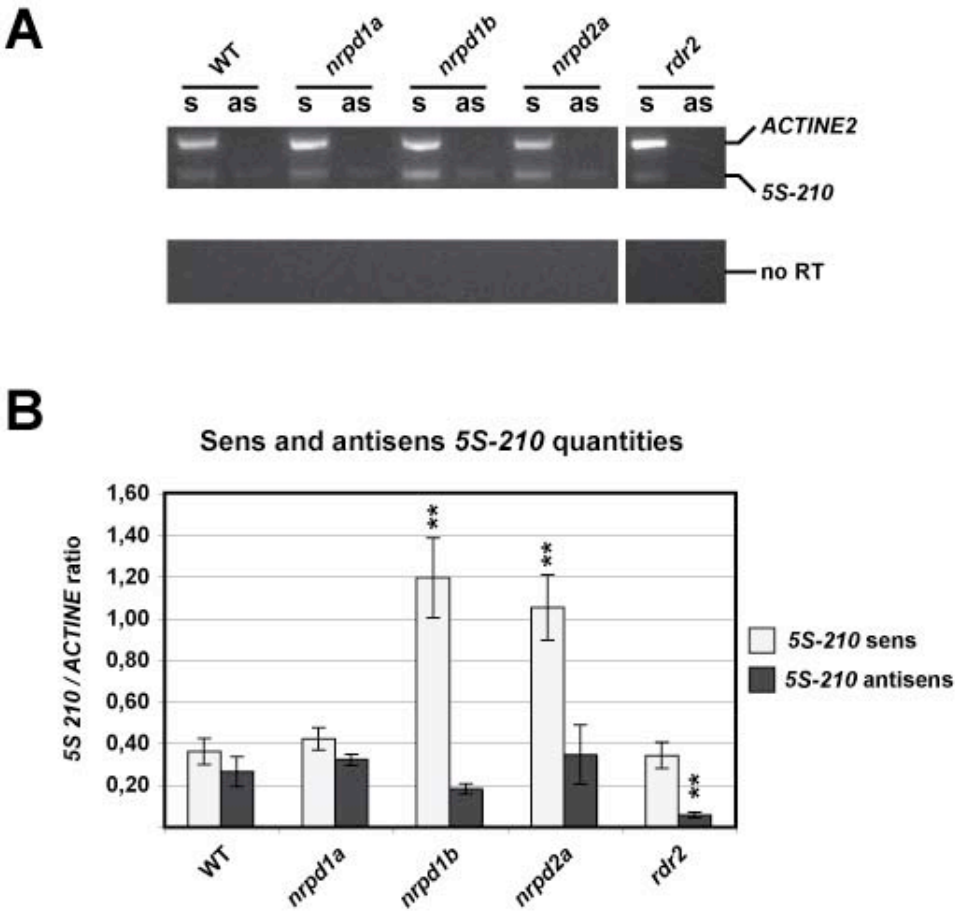


Figure 5 : RT-PCR detection of sens and antisens *5S-210* transcripts in WT, *nrpd1a*, *nrpd1b*, *nrpd2a, rdr2* mutant plants.

(A) Expression of *ACTIN 2* was used to normalize the *5S-210* transcripts amounts. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT).

(B) A graphic representation of 6 independent experiments is given. The standard deviation of the mean is indicated on each bar. Asterisks indicate values significantly different from the WT sens or antisens value (Mann-Whitney test, * P<0.01) .

on this compaction. Therefore, NRPD1b has the ability to act on the chromatin of 5S rDNA from chromosome 4 in a NRPD1a-independent manner.

We observed no significant variation in the proportion of nuclei with decompacted 5S signals at chromosomes 3 and 5 in WT (29%), *nrpd1a*, *nrpd1b* and *nrpd2a* mutants (Figure 4). These results show that *nrpd1a* and *nrpd1b* mutations have no visible effect on chromatin compaction of 5S arrays from chromosomes 3 and 5. We cannot conclude to an absence of impact since the 5S RNA heterogeneity observed in *nrpd1a* and *nrpd1b* probably results from a non detectable decompaction of some 5S units.

From these analyses, we conclude there is a correlation between the large silencing release and the decompaction of 5S rDNA on chromosome 4 in *nrpd1b* mutant.

5S-210 antisens is produced by RDR2

In order to know whether 5S-210 are sens and/or antisens transcripts, and to define the contribution of the different actors, we have performed RT-PCR experiments. To define the role of RDR2 in the 5S-210 production, the *rdr2* mutant was also analyzed. First, both sens and antisens 5S-210 transcripts are produced (Figure 5).

Sens 5S-210 transcripts are present in each genetic context, demonstrating they are transcribed neither by Pol IVa or Pol IVb nor by RDR2. 5S-210 sens transcripts overaccumulated by a 2 to 3 factor in *nrpd1b* and *nrpd2a* but not in *nrpd1a* and *rdr2* accumulating similar quantities than WT plants. These results show that repression is lost *in nrpd1b.* Furthermore, the sequence analysis has shown the same populations of 5S-210 sens RNAs, in terms of chromosome origin and heterogeneity, than previously shown on figures 2 and 3.

Upstream genes of the RdDM pathway involved in the production of siRNAs include RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase) which is proposed to transcribe single stranded RNA into double-stranded RNA. The results show that RDR2 synthesizes the antisens 5S-210 transcript, absent in the *rdr2* mutant. Similar amounts of the antisens transcript were observed in all genetic contexts (except *rdr2*). These results show that 5S-210 antisens transcripts are produced by RDR2 independently of the sens transcripts amount. There is therefore a limited production of antisens

```
Major_5S_210_chr5          GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCA 50
Minor_5S_210_70T_chr5      GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCA 50
Major_5S_210_chr4          GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCA 50
Minor_5S_210_96T_chr4      GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCA 50

Major_5S_210_chr5          GTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCCGGGA 100
Minor_5S_210_70T_chr5      GTTAAGCGTGCTTGGGCGATAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCCGGGA 100
Major_5S_210_chr4          GTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCCGGGA 100
Minor_5S_210_96T_chr4      GTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCTGGGA 100

Major_5S_210_chr5          AGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTGGTT 150
Minor_5S_210_70T_chr5      AGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTGGTT 150
Major_5S_210_chr4          AGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTTTTTTT------TTTTTTTTGGTT 144
Minor_5S_210_96T_chr4      AGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTTTTTTT------TTTTTTTTGGTT 144

Major_5S_210_chr5          AAAACTTTATGACTCCATAACTTTTAGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATG 200
Minor_5S_210_70T_chr5      AAAACTTTATGACTCCATAACTTTTAGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATG 200
Major_5S_210_chr4          AAAACTTTATGACTCTATAACTTCTATACCGTGAGGCCAAACTTGGCATG 194
Minor_5S_210_96T_chr4      AAAACTTTATGACTCTATAACTTCTATACCGTGAGGCCAAACTTGGCATG 194

Major_5S_210_chr5          TGATACCTTTTCG 213
Minor_5S_210_70T_chr5      TGATACCTTTTCG 213
Major_5S_210_chr4          TGATACCTTTTCG 207
Minor_5S_210_96T_chr4      TGATACCTTTTCG 207
```

Figure S1 : Sequence alignment of 5S-210 transcripts

Representative sequence alignment of heterogenous 5S-210 transcripts from chromosomes 4 and 5 with the major/reference sequence from the same chromosome. Nucleotide positions diverging from the reference are in bold. The chromosome-specific T-stretch is in grey.

transcripts by RDR2. Sequence analysis of antisens transcripts has revealed that RDR2 transcribes sens transcripts without any selection.

DISCUSSION

Although the impact of the Polymerase IV on 5S rDNA was demonstrated on the basis of DNA hypomethylation, decrease of 5S small RNA accumulation and chromatin decompaction in *pol IV* mutant (Onodera et al., 2005; Douet et al., 2008), the relative impact of Pol IVa and Pol IVb, their potential selective action on the different 5S arrays and the consequence of *Pol IV* mutations on 5S rDNA silencing were unknown.

In this paper, we have shown that silencing of 5S RNA genes from chromosome 5 is controlled by Pol IVa and b at the qualitative level ; both isoforms seem to have an equivalent effect. Their mutation leads to the derepression of heterogenous 5S RNA genes without an increase of total 5S RNA amount. Silencing of 5S RNA genes from chromosome 4 is controlled by Pol IVa at the qualitative level, and Pol IVb exerts a major role acting at both qualitative and quantitative levels. The large silencing release is correlated to the decompaction of 5S rDNA at chromosome 4 in *nrpd1b* mutant. This is in agreement with the previously reported 5S rDNA hypomethylation as well as with the reduction or elimination of 5S siRNAs (the 1003 siRNA) in both *nrpd1a* and *nrpd1b* mutants (Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005; Vaucheret, 2005; Pontes et al., 2006; Douet et al., 2008).

In the RdDM pathway of transcriptional gene silencing (Wassenegger, 2000; Wassenegger, 2005; Huettel et al., 2007; Mathieu and Bender, 2004), double-stranded RNAs generated with the involvement of RDR2 are cleaved by DCL3, and the resulting siRNAs are loaded into AGO4/RISC and/or AGO6/RISC complexes that mediate a *de novo* methylation of cytosines within DNA sequences complementary to the siRNAs (Wassenegger, 2005; Cao et al., 2003; Zilberman et al., 2003; Xie et al., 2004; Zheng et al., 2007). Pol IVa is thought to act at an initial step of the pathway, upstream of RDR2 (Pontes et al., 2006), and CLSY1, a SWI-SNF family protein, is supposed to act at the interface between Pol IVa and RDR2, presumably facilitating the generation of dsRNAs (for a review, Pikaard et al, 2008). Pol IVb, DRD1, a SWI-

SNF family protein, and DRM2 are thought to collaborate in the siRISC-directed DNA methylation process through an as yet unknown mechanism (Huettel et al., 2007; Pikaard et al., 2008). In this model, *pol IVa*, *rdr2* and *polIVb* mutants are expected to have similar consequences. Concerning 5S rDNA, our results have shown that these three mutants have similar effects on 5S RNA genes from chromosome 5, on the proportion of heterogenous 5S RNA (*nrpd1a* and *b*) and on 5S-210 amounts (*rdr2*, *nrpd1a*, *nrpd1b*), without detectable chromatin changes (*nrpd1a* and *b*).

Interestingly, the situation is very different for 5S RNA genes from chromosome 4. Whereas similar amounts of transcripts were obtained in *rdr2* and *nrpd1a* mutants, higher amounts of transcripts correlated with 5S rDNA decompaction is observed in *nrpd1b*. Therefore, Pol IVb has an additionnal role independent of both RDR2 and Pol IVa on chromosome 4. Eventhough Pol IVb remains a mystery, it is involved in the compaction of 5S rDNA at chromosome 4, suggesting that Pol IV/RISC complex recruits repressive epigenetic marks on 5S arrays, notably on chromosome 4. We know that the histone deacetylase HDA6 (Vaillant et al., 2007) and the histone methyltransferases SUVH4, SUVH5 and SUVH6 (Ebbs and Bender, 2006) act on 5S rDNA but it is unknown whether they are specific for one of the 5S arrays.

We show that 5S-210 sens transcripts persist in *nrpd1a, nrpd1b* and *rdr2* mutants, demonstrating their initial formation is Pol IV independent. Actually, we have no evidence whether they are produced by Pol I, II or III. 5S-210 AS transcripts are absent in the *rdr2* mutant, providing evidence they are generated by RDR2 from the long 5S-210 sens transcript. This strongly suggests that 5S-210 participates to the Pol IV-mediated 5S silencing. Moreover, the long 5S-210 dsRNA, likely resulting from the association of S and AS 5S-210 transcripts, would be a good candidate for production of the 1003 5S siRNA , whose sequence is present in the 5S-210 sequence.

Previous models for the RdDM pathway have suggested that Pol IVa transcribes methylated DNA or transcripts of methylated loci, with Pol IVa transcripts being amplified or made double-stranded by RDR2. Interestingly, according to our results, RDR2 acts upstream of Pol IVa at 5S genes since both sense and antisens transcripts persist in *nrpd1a*. Although Pontes et al (2006) have reported that NRPD1a localization is unaffected in *rdr2*, consistent with Pol IVa acting upstream of RDR2, they also observed some overlap between 5S gene loci and RDR2. The

presence of RDR2 at 5S loci, although RDR2 is mainly present in nucleolar dots, is consistent with a early action of RDR2 at 5S loci in the RdDM pathway. This mode of Pol IVa function *i.e*. downstream of RDR2, has been proposed in different models (Matzke et al., 2006; Pikaard et al., 2008).

In conclusion, we propose that the two-step RdDM model of Matzke et al. (2006) which perfectly fits to our observations, applies to 5S arrays. In the first step (*de novo* methylation step), a polymerase other than Pol IV produces sens transcripts. Then RDR2, present at 5S loci, synthesizes double-stranded RNA from the single-stranded primary transcript and DCL3 (possibly at 5S loci ; Pontes et al., 2006) processes double-stranded RNA to the heterochromatin-specific 24-nt small 5S RNAs. The AGO4/NRPD1b/DRM2-containing silencing complex guided by siRNAs *de novo* methylates 5S rDNA. In the second/reinforcement step, Pol IVa which preferentially transcribes methylated DNA, produces transcripts (aberrant RNAs ?) that are copied by RDR2 and subsequently diced by DCL3.

This model has the advantage to explain why unlike *nrpd1a*, *nrpd1b* mutants accumulate 5S-derived siRNAs (Vaucheret, 2005). In the *polIVa* mutant, the 5S siRNA produced in the first step are completely used for *de novo* methylation, whereas they are not in the *pol IVb* mutant and are therefore accumulated. In the WT, a massive production of 5S siRNAs is performed during the second/reinforcement step.

In addition to this process common to 5S arrays from chromosomes 4 and 5, a Pol IVb action, independent of RDR2 and Pol IVa specifically applies to chromosome 4, probably by recruiting remodelling factors. Our results open the question about the interest for the plant to have a 5S array whose expression is more dependent on Pol IVb. There is a need of the plant kingdom for rapid, reversible changes in gene expression, to respond to environmental changes. We propose that the 5S array of chromosome 4 might be the plastic 5S rDNA fraction of the genome.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Arabidopsis thaliana wild type, *pol IV* (*nrpd1a-1*, *nrpd1-1b*, *nrpd2a-1*) and *rdr2-1* young plantlets were from Columbia ecotype. *nrpd2a-1* seeds were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (Stock # SALK 095689). *nrpd1a-1, nrpd1-1b* and *rdr2-1* seeds were obtained from Dr T. Lagrange (University of Perpignan, France). After synchronization 2 days at 4°C, seeds were grown on a germination medium (MS Salt [Duchefa Biochemie] supplemented with 3% sucrose and 0.8% BactoAgar) in a growth chamber using a 16h light (120 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$) / 8h dark regime at 23°C.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Prior to use, tissues were fixed in ethanol/acetic (3:1) solution. Probes were labeled by PCR using gene specific primers with biotin-16-UTP (Roche) or digoxigenin-11-UTP (Roche). FISH experiments were performed according to Mathieu et al. (2003). Biotin-labeled (5S rDNA) and digoxigenin-labeled (25s rDNA) probes were used. Avidin conjugated with Texas Red (1:500; Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100; Vector Laboratories) and avidin–Texas Red (1:500) were used for the detection of the biotin-labeled probe; mouse anti-digoxigenin (1:125; Roche) followed by rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500; Sigma) and Alexa 488-conjugated goat-anti-rabbit (Molecular Probes) were used for the detection of the digoxigenin-labeled probe. Before microscopic analysis, nuclei were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole).

Microscopy and image processing

For microscopic analysis, an epifluorescence Imager Z1 microscope (Zeiss) with an Axiocam MRm camera (Zeiss) was used. Fluorescence images for each fluorochrome were captured separately through the appropriate excitation filters. The images were pseudocolored, merged and processed with the Adobe Photoshop software (Adobe Systems). 45 to 62 nuclei were analyzed for each genotype.

Compaction of 5S arrays from chromosomes 4 and chromosomes 3+5 were considered separately. Each group of 5S array was considered as decompacted when at least one signal was decondensed.

Statistical analysis

Proportion of 5S-210 transcripts from chromosomes 4 and 5 and percentage of heterogenous 5S-210 transcripts were compared with Fisher's exact test for a 2x2 contingency table. The probabilities were calculated from a one-tailed test. Statistical analysis of 5S-210 transcripts amounts were performed using the nonparametric Mann-Whitney U-test with mean values comparison. For statistical analyses of 5S rDNA compaction a comparison of proportions Z-test was used. The probabilities were calculated from a one-tailed test. Interval confidence (IC) was calculated for each proportion with a confidence level of 99%.

RT-PCR analysis

Aliquot of 1µg of total RNA was treated with DNA-free™ Kit (Ambion) and 100ng of DNase-treated total RNA was used as input in semi-quantitative RT-PCR reactions using the OneStep RT-PCR Kit (Quiagen). Controls were performed without reverse transcription step to detect contaminating DNA. Amplification of *ACTIN2* RNA was used as an internal control and to normalize RNA amounts. Detection of 5S-210 and *ACTIN2* transcripts was performed in the same reaction tube. Amplification conditions: 50°C for 30min (reverse transcription step); 95°C for 15min (reverse transcriptase inactivation step); 35 cycles [95°C for 30s; 51°C for 30s; 72°C for 45s]; 72°C for 10min. 5S-210 transcripts were amplified using primers RTPCR5S1 (5'-GGATGCGATCATACCAG-3') and 5SUNIV2 (5'-CGAAAAGGTATCACATGCC-3'). *ACTIN2* transcripts were amplified using primers ACT2-F and ACT2-R according to Vaillant et al. (2007).

For sens and antisens 5S-210 transcripts analysis, RT-PCR experiments were performed in two steps. For the reverse transcription step, only one primer is provided, which is complementary to the putative RNA encoded either by the sens strand or by the opposite strand. For the PCR step, the other primer is added. Reverse transcription of ACTIN 2 RNA was used as a control of a sens transcription.

Amounts of amplicons were estimated using a Versadoc coupled to the QuantityOne software (Biorad).

Subcloning and Sequencing

PCR products were subcloned in the pGem-T easy plasmid using the pGem-T vector system (Promega). Sequencing was performed using the CEQ 2000 Dye terminator cycle sequencer (Beckman). Computer sequence analysis was performed with the Clustawl program (www.infobiogen.fr).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Lagrange for providing seeds of *nrpd1a, nrpd1b and rdr2* mutants, B. Laubin for technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Blaise Pascal, the Université d'Auvergne, the INSERM, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI/BCMS), the Auvergne region and the INCA (Institut National du Cancer, réseau Epipro). J.D. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, **22**, 268-280.

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.

Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. and Jacobsen, S.E. (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, **13**, 2212-2217.

Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, **12**, 1138-1144.

Chan, S.W., Henderson, I.R., Zhang, X., Shah, G., Chien, J.S. and Jacobsen, S.E. (2006) RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in arabidopsis. *PLoS Genet*, **2**, e83.

Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, **303**, 1336.

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.

Douet, J., Blanchard, B., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2008) Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during postembryonic 5S rDNA chromatin remodelling. *Plant Cell Physiol*.

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.

Ebbs, M.L. and Bender, J. (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell*, **18**, 1166-1176.

El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. and Lagrange, T. (2007) Reiterated WG/GW motifs

form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev*, **21**, 2539-2544.

Elmayan, T., Proux, F. and Vaucheret, H. (2005) Arabidopsis RPA2: a genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr Biol*, **15**, 1919-1925.

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.

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.

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.

Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S. and Jacobsen, S.E. (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell*, **126**, 93-106.

Mathieu, O. and Bender, J. (2004) RNA-directed DNA methylation. *J Cell Sci*, **117**, 4881-4888.

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

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.

Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. and Matzke, A.J. (2006) RNA-directed DNA methylation and Pol IVb in Arabidopsis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 449-459.

Mosher, R.A., Schwach, F., Studholme, D. and Baulcombe, D.C. (2008) PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3145-3150.

Murata, M., Heslop-Harrison, J.S. and Motoyoshi, F. (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.

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.

Pikaard, C.S. (2006) Cell biology of the Arabidopsis nuclear siRNA pathway for RNA-directed chromatin modification. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 473-480.

Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. and Wierzbicki, A.T. (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci*, **13**, 390-397.

Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. and Pikaard, C.S. (2006) The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*, **126**, 79-92.

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.

Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J. and Hannon, G.J. (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, **443**, 1008-1012.

Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S. and Mathieu, O. (2006) MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep*.

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.

Vaucheret, H. (2005) RNA polymerase IV and transcriptional silencing. *Nat Genet*, **37**, 659-660.

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.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.

Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2007) Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo J*, **26**, 1691-1701.

Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.

Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, **14**, 1214-1220.

Discussion

et

Perspectives

1.Le remodelage de la chromatine dans les étapes précoces du développement

Mes travaux ont débuté par la caractérisation des évènements de remodelage de la chromatine des gènes d'ARNr 5S au début du développement. Précédemment, les recherches menées par notre équipe avaient permis de montrer que les noyaux de cotylédons récoltés 2 jours après germination présentent une forte condensation des séquences d'ADNr 5S et une quantité d'hétérochromatine deux fois moindre par rapport à la plante adulte. Les analyses Northern blot ont révélé de très faibles quantités de transcrits 5S dans ces tissus. Du fait de la forte compaction des loci d'ADNr 5S, il est peu probable que les ARNr 5S observés, dans les plantes 2 jours après germination, proviennent d'une transcription post-germinative. C'est pourquoi il a été proposé qu'ils soient issus de réserves accumulées au sein de la graine. Au 4ème jour après germination, les loci d'ADNr 5S se présentent sous une forme équivalente à ce qui est retrouvé dans la plante adulte sauvage. En effet, les loci sont partagés entre caractéristiques hétérochromatiques et euchromatiques. De plus, la quantité de transcrits 5S est égale à celle trouvée dans la plante adulte indiquant que la mise en place de la transcription a eu lieu. L'hypothèse émise était donc que la décondensation progressive des loci d'ADNr 5S du 2ème jusqu'au 4ème jour après germination permettait l'installation de la transcription des gènes d'ARNr 5S et ce, probablement au niveau de boucles euchromatiques émanant de l'hétérochromatine (Mathieu et al., 2003a).

1.1.L'ADNr 5S au 2ème après germination en conditions sauvage et *nrpd2a*

Pendant ma thèse, j'ai montré qu'au 2ème jour post-germination, la méthylation asymétrique des séquences d'ADNr 5S en contexte sauvage est élevée alors qu'elle est très fortement réduite en contexte *nrpd2a*. Ceci implique que l'ARN polymérase IV est responsable de cette méthylation qui pourrait probablement intervenir au moment de la formation de la graine pour entraîner la répression transcriptionnelle et la compaction de l'ADNr 5S. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que l'ARN pol

IV est présente dans les fleurs dans des quantités nettement supérieures à celle des feuilles (Pontier et al., 2005), malheureusement aucune donnée n'est disponible concernant la silique.

Nous avons pu également observer que les noyaux de plantes sauvage et *nrpd2a*, en dépit d'une méthylation ADN différente, possèdent des niveaux de compaction comparables de leur ADNr 5S. Ceci implique qu'avant le 2ème jour post-germination, la compaction de la chromatine possède une certaine indépendance vis à vis de la méthylation ADN. Il notamment été rapporté que la déshydratation, qui est une caractéristique de la graine, a un impact significatif sur la condensation de l'ADN (Zluvova et al., 2001). De manière alternative, ce phénomène pourrait être dû à l'utilisation de variants d'histones particuliers comme il en existe, par exemple, pour compacter le génome des gamétophytes mâles chez le lys (Ueda et al., 2000).

1.2.La décompaction de l'ADNr 5S

A partir du 3ème jour après germination, nous avons relevé une forte décondensation de l'ADNr 5S chez la plante sauvage comme en contexte *nrpd2a*. Dans la plante sauvage, ce phénomène est corrélé à une déméthylation active de l'ADNr 5S que nous avons pu attribuer à l'activité de la déméthylase ROS1; cependant nous ne pouvons exclure un rôle des déméthylases DME, DML2 et DML3 dans ce processus. De plus, nous n'avons pas détecté de décondensation significative de l'ADNr 5S dans le mutant *ros1*, pourtant ces plantes sont tout à fait viables, il est donc probable qu'une décompaction mineure intervienne dans les plantes *ros1* permettant ainsi à certaines unités d'ADNr 5S de s'exprimer. Concernant le mutant *nrpd2a*, nous n'avons pas observé de déméthylation attribuable à ROS1, sans doute en raison de l'extinction de l'expression de *ROS1* en contexte hypométhylé (Mathieu et al., 2007). Ces résultats nous indiquent que bien que la compaction observée au 2ème jour après germination soit indépendante de la méthylation, la décondensation quant à elle nécessite la déméthylation asymétrique de l'ADNr 5S.

Pour la plante, l'intérêt de ces évènements de décompaction et déméthylation pourrait être de déverrouiller les systèmes de répression mis en place lors de la formation de la graine, notamment en effaçant les patrons de méthylation

asymétrique de l'ADNr 5S. Ceci permettrait donc de laisser la place à l'installation de nouvelles marques visant à instaurer une structure chromatinienne adéquate pour la transcription efficace des gènes d'ARNr 5S.

1.3.La condensation de l'ADNr 5S

Chez la plante sauvage, à partir du 4ème jour après la germination, nous avons pu observer une rapide recompaction des séquences d'ADNr 5S. Cependant, ce niveau de compaction est inférieur à celui qui a été observé au 2ème jour de développement. Au 5ème jour post-germination, les loci d'ADNr 5S présentent une fraction hétérochromatique et une fraction euchromatique, cette dernière contenant probablement les gènes d'ARNr 5S transcrits. Ces résultats suggèrent donc qu'au moment de la germination, la chromatine de l'ADNr 5S doit subir une réorganisation plus sévère qu'une simple décondensation pour acquérir des caractéristiques adultes. L'absence d'une telle condensation dans la plante *nrpd2a* nous indique que l'ARN polymérase IV est clairement impliquée dans cet évènement de recompaction.

1.4.Les effets des actions combinées de ROS1 et de l'ARN polymérase IV

L'étude de la méthylation asymétrique, nous révèle que le phénomène de recompaction n'est pas accompagné d'une augmentation de la méthylation, au contraire, la déméthylation assurée par ROS1 décrite précédemment se poursuit jusqu'au 5ème jour. Pourtant la participation de l'ARN polymérase IV apparaît évidente dans le phénomène de condensation; de plus, elle est décrite comme étant directement impliquée dans la méthylation *de novo* notamment des séquences d'ADNr 5S. Ceci nous conduit donc à avancer l'hypothèse selon laquelle l'ARN polymérase IV ne serait pas active de la même façon sur toutes les unités d'ADNr 5S. En effet, il a été démontré que seule une fraction des gènes d'ARNr 5S est effectivement exprimée, l'autre partie, très probablement sous une forme hétérochromatique, demeure silencieuse. Il est possible que l'ARN polymérase IV participe à définir les séquences à exprimer ou à réprimer.

Des travaux menés par notre équipe ont pu démontrer, par analyse de données issues du séquençage du génome, l'existence d'un gradient de cytosines en contextes asymétriques le long du bloc d'ADNr 5S du chromosome 5. En effet la proportion des sites CNN, comparée à celles des sites CG et CNG, est plus importante du coté hétérochromatique que du coté euchromatique du bloc. En tenant compte du fait que la méthylation des sites asymétriques est uniquement due au système de méthylation *de novo*, dont l'ARN pol IV fait partie, il serait logique que les unités d'ADNr 5S les plus proches de l'hétérochromatine soient particulièrement sensibles à l'action de l'ARN polymérase IV.

Les effets combinés de la déméthylation par ROS1 et de la méthylation *de novo*, impliquant la participation de l'ARN polymérase IV, seraient donc à l'origine d'une réorganisation de la méthylation ADN au début du développement. Nos résultats suggèrent donc que l'action de ROS1 permettrait d'effacer le patron de méthylation installé durant la formation de la graine visant à la répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S. Dans le même temps, l'ARN polymérase IV participerait à l'établissement d'un nouveau patron permettant de réprimer de manière sélective les gènes les plus hétérochromatiques.

1.5.Les foci hétérochromatiques surnuméraires

Parallèlement à la réorganisation de l'ADNr 5S, nous avons constaté la présence dans les noyaux de foci hétérochromatiques surnuméraires à partir du 3ème jour de développement. Ces derniers sont complètement résorbés chez la plante adulte alors qu'ils sont maintenus en contexte *nrpd2a*. Les expériences de FISH nous indiquant qu'il ne s'agissait ni d'ADNr 45S, ni d'ADNr 5S, ni de répétitions centromériques de 180 pb, nous avions émis deux hypothèses quant à la nature de ces foci. La première d'entre elles était que les foci provenaient d'une fragmentation de l'hétérochromatine, et plus particulièrement des familles de séquences faiblement ou moyennement répétées. L'analyse FISH avec des sondes *TSI* et *Athila* nous a permis d'infirmer cette hypothèse. En effet, ces séquences ne colocalisent ni avec les chromocentres, ni avec les foci, au 3ème jour post-germination chez le sauvage ou chez la plante *nrpd2a*. La deuxième hypothèse était qu'une hétérochromatinisation transitoire de séquences normalement euchromatiques pouvait entraîner

l'observation de ces foci. Cependant l'hybridation de noyaux avec 15 BACs couvrant la majeure partie du bras gauche du chromosome 5 ne montra, encore une fois, aucune colocalisation significative avec les foci.

2.Pol IVa et Pol IVb dans la régulation de l'ADNr 5S

Nous avons pu voir que le début du développement est une période où l'ARN polymérase IV est particulièrement active. Partant de cette constatation, nous avons cherché à démontrer l'éventuelle implication des formes Pol IVa et Pol IVb dans le « silencing » transcriptionnel des gènes d'ARNr 5S chez la jeune plante. Pour cela, nous avons analysé l'expression du 5S-210 qui est considéré comme un témoin de dérépression. L'utilisation du 5S-210 pour l'étude de la répression transcriptionnelle présente deux avantages. Le premier étant qu'il offre la possibilité, après analyse de séquence, de connaître l'origine du transcrit, c'est-à-dire de savoir de quel bloc d'ADNr 5S il est issu. Ensuite, l'étude de la séquence transcrite qu'il contient, permet d'avoir une idée de l'ampleur de la dérépression. En effet, en contexte hypométhylé par exemple, des transcrits 5S-210 présentant des mutations sont exprimés alors qu'ils sont normalement réprimés dans la plante adulte sauvage. De plus, la proportion de ces 5S-210 hétérogènes augmente en fonction de la force de la dérépression (Vaillant et al., 2006).

2.1.Coopération de Pol IVa et Pol IVb dans la répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S

L'analyse qualitative de la transcription nous indique que les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b* et *nrpd2a* entraînent une dérépression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S. Dans les trois mutants, cette dernière se manifeste par l'augmentation significative de la proportion des 5S-210 hétérogènes par rapport à la plante sauvage. De plus, à l'intérieur de chaque chromosome, cette proportion est identique dans les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b* et *nrpd2a*. Ces résultats nous indiquent donc que Pol IVa et Pol IVb agissent dans la même voie pour maintenir la répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S hétérogènes.

L'analyse cytologique nous indique que les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b*, *nrpd2a* possèdent des compactions des loci d'ADNr 5S des chromosomes 3 et 5

équivalentes à celle de la plante sauvage. Nous pouvons donc conclure que la dérépression transcriptionnelle du locus d'ADNr 5S du chromosome 5 n'est pas accompagnée d'une altération significative de la structure chromatinienne.

Ces résultats montrant la coopération de Pol IVa et Pol IVb dans le « silencing transcriptionnel » sont en accord avec les travaux des groupes rapportant des phénotypes quasi identiques dans les deux mutants correspondants. En effet, il a été observé que les mutations *nrpd1a* et *nrpd1b* entraînaient la perte (ou la diminution) des siRNA 5S ainsi que la déméthylation de l'ADNr 5S dans des proportions équivalentes.

2.2.Un nouveau rôle pour Pol IVb sur le locus d'ADNr 5S du chromosome 4

L'analyse semi-quantitative des transcrits 5S-210 a permis de révéler une forte dérépression du locus d'ADNr 5S du chromosome 4 dans les mutants *nrpd1b* et *nrpd2*a en comparaison des plantes sauvages ou *nrpd1a*. Nos résultats suggèrent une transcription plus active des unités déréprimées par la perte de « silencing » exercée par la voie Pol IVa-Pol IVb plutôt que la dérépression de nouvelles unités. En effet, cette augmentation de transcrits n'est pas accompagnée de l'augmentation de la proportion des 5S-210 hétérogènes.

L'augmentation de la transcription du bloc 5S du chromosome 4 n'étant observée que dans les mutants *nrpd1b* et *nrpd2a*, ce phénomène est donc indépendant de la forme Pol IVa et directement lié à la forme Pol IVb. L'analyse transcriptionnelle dans le mutant *rdr2* nous indique que ce phénomène est également indépendant de RDR2.

Des expériences de FISH nous ont permis de confirmer ces résultats. En effet, nous avons pu observer une décompaction significative du bloc 5S du chromosome 4 uniquement dans les mutants *nrpd1b* et *nrpd2a*. Donc, à l'échelle chromatinienne, Pol IVb semble également jouer un rôle sur le locus du chromosome 4 et d'une façon indépendante de Pol IVa. On peut se demander dans quelle mesure la méthylation influence la compaction de l'ADNr 5S puisqu'il est démontré que les mutants *nrpd1a* et *nrpd1b* présentent des patrons de méthylations identiques (Pontes et al., 2006; Pontier et al., 2005).

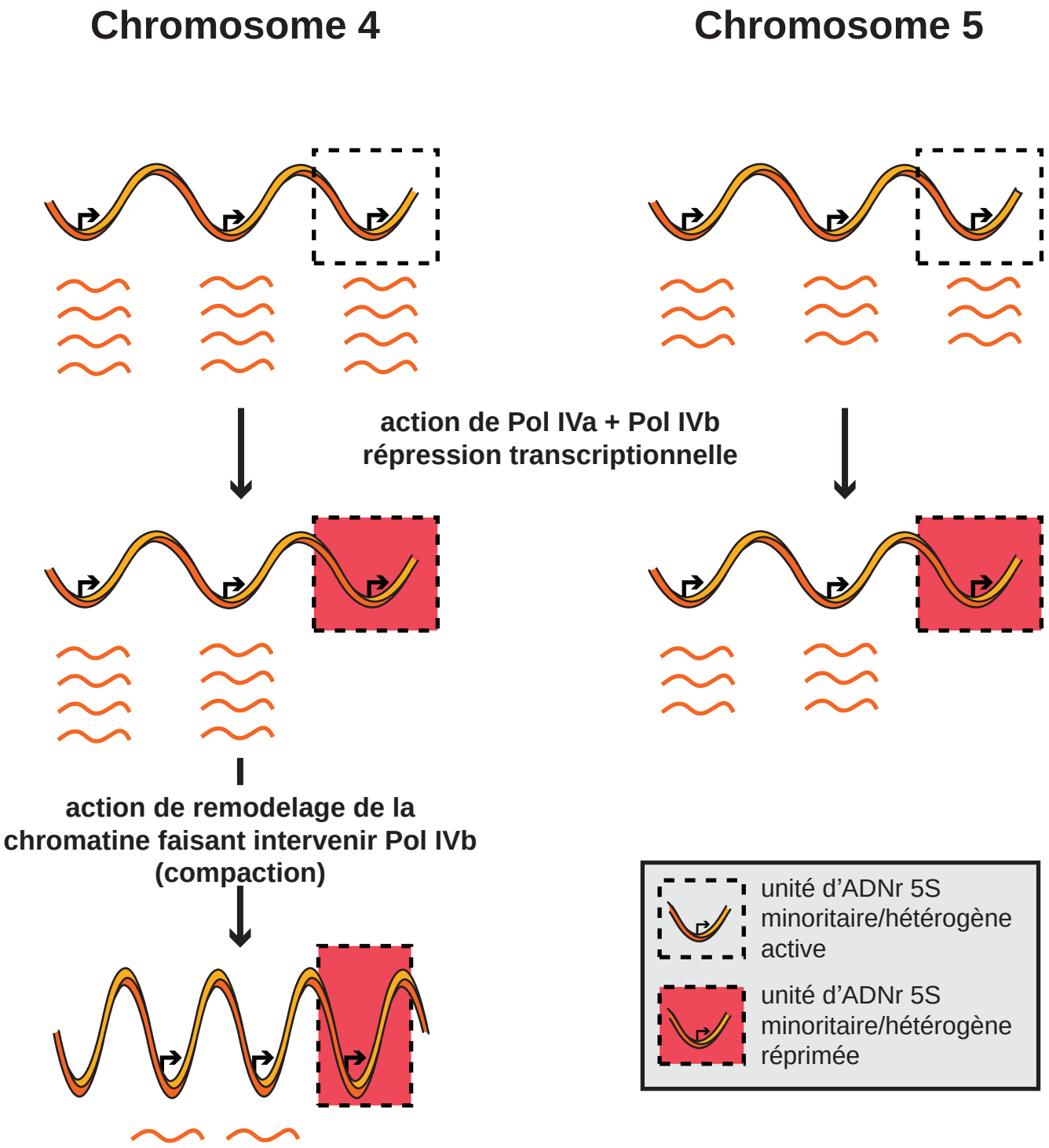


Figure 20: Modèle d'action des ARN polymérase IVa et IVb sur l'ADNr 5S. L'action commune de Pol IVa et Pol IVb permettrait le "silencing" des unités d'ADNr 5S minoritaires/hétérogènes des blocs 5S des chromosomes 4 et 5. Sur l'ADNr 5S du chromosome 4 uniquement et indépendamment de Pol IVa, Pol IVb participerait au remodelage de la chromatine entraînant ainsi une inhibition de la transcription. La compaction engendrée pourrait diminuer l'accès des facteurs de transcription aux gènes d'ARNr 5S du chromosome 4.

L'indépendance du rôle supplémentaire de Pol IVb vis-à-vis de Pol IVa et de RDR2 suggèrent donc une indépendance par rapport à la voie classique Pol IVa-Pol IVb. Ceci impliquerait également une indépendance vis-à-vis des petits ARN de 24 nt produits par la voie RDR2-DCL3.

La voie impliquant la coopération des formes Pol IVa et Pol IVb permettrait de réprimer sélectivement l'expression des unités d'ADNr 5S produisant les transcrits 5S-210 hétérogènes. Il pourrait être envisagé que Pol IVb permette le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine entraînant ainsi un verrouillage plus efficace des gènes d'ARNr 5S du chromosome 4 (Figure 20).

2.3.Le transcrit 5S-210 et RDR2

Nous avons pu mettre en évidence que le transcrit 5S-210 est majoritairement retrouvé sous la forme ARN double brin (ARNdb) dans la plante sauvage. Compte tenu du fait que la séquence du 5S-210 présente de l'homologie pour le siRNA 1003 (un siRNA témoin ciblant l'ADNr 5S), il est tentant d'imaginer que le 5S-210 puisse être la composante ARN à l'origine du « silencing » dépendant de l'ARN polymérase IV exercé sur l'ADNr 5S. RDR2, dans la bibliographie, est intimement liée aux fonctions de l'ARN polymérase IV et plus particulièrement à la forme Pol IVa. Nous avons pu déterminer que l'ARNdb 5S-210 est formé à partir d'un transcrit initialement produit par une polymérase autre que l'ARN polymérase IV. La synthèse du brin antisens, quant à elle, est dépendante de l'activité de RDR2. L'analyse des transcrits 5S-210 sens et antisens en conditions sauvage, *nrpd1a*, *nrpd1b* et *nrpd2a* nous a permis de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, l'augmentation de 5S-210 relative à la dérépression du chromosome 4 dans les mutants *nrpd1b* et *nrpd2a* est attribuable uniquement à l'augmentation du transcrit 5S-210 sens. En effet, les brins antisens sont retrouvés dans les mêmes quantités dans tous les contextes (sauf *rdr2* bien entendu). Ce dernier point nous permet de dire que l'activité de RDR2 est limitante dans la production de l'ARNdb 5S-210 puisque la quantité de brin antisens est invariable même dans des conditions où la quantité de brin sens est nettement augmentée (*nrpd1b* et *nrpd2a*). Enfin, d'après les séquences antisens dont nous disposons pour les différentes conditions, RDR2 ne semble pas sélectionner de transcrit 5S-210 sens particulier pour la synthèse d'antisens.

2.4.Modèle d'action de la voie ARN polymérase IV dépendante des siRNA sur l'ADNr 5S

Un résultat particulièrement intéressant repose sur le fait que le transcrit 5S-210 antisens est présent dans le mutant *nrpd1a*. Ceci suggère que, si l'ARNdb 5S-210 est à l'origine du siRNA 1003, alors RDR2 se trouverait en amont de la forme Pol IVa, et non en aval comme cela a été avancé dans de nombreux modèles. Nous suggérons donc un système où une ARN polymérase (autre que Pol IV) assure la transcription du 5S-210 sens que RDR2 prendrait en charge directement au locus dont est issu ce même 5S-210 sens. Ceci suppose une localisation de RDR2 sur l'ADNr 5S, ce qui est en accord avec les observations de Pontes et al. (2006). Ces résultats nous font donc adhérer au modèle présenté par Matzke et al. (2006) décrit dans le paragraphe 2.6 du chapitre 3 (Figure 17). Dans ce modèle, qui est appliqué aux séquences LTR, les auteurs proposent que l'ARN polymérase II soit à l'origine de la production d'un transcrit simple brin pris en charge directement par RDR2 pour une transformation en ARNdb. Une première vague de siRNA résultant du clivage de l'ARNdb par DCL3 permettrait de diriger la méthylation des séquences LTR par un complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2. Ensuite, les séquences nouvellement méthylées ou des transcrits aberrants issus de ces séquences méthylées deviendraient des substrats pour la forme ARN pol IVa. La transformation du transcrit produit par l'ARN pol IVa en ARNdb ferait intervenir une nouvelle fois RDR2, puis l'action de DCL3 engendrerait une seconde vague de siRNA permettant le renforcement de la méthylation par le complexe Pol IVb-AGO4-DRD1-DRM2. Ce modèle transposé à l'ADNr 5S est parfaitement cohérent avec nos résultats. Cependant nos observations ne nous permettent pas de valider l'intervention de l'ARN polymérase II sur l'ADNr 5S dans ce modèle.

3.Perspectives

L'action de la forme ARN pol IVb sur le locus d'ADNr 5S du chromosome 4 est l'un des points qui soulève le plus de questions. Il serait donc intéressant de déterminer le(s) partenaire(s) de Pol IVb lui permettant d'agir de la sorte sur la

chromatine. Il paraîtrait logique que cette activité implique une protéine de remodelage de la chromatine. DRD1, décrite comme partenaire de Pol IVb, ne semble pas pourtant la candidate idéale. En effet, DRD1 étant directement impliquée dans la méthylation *de novo*, si l'effet observé sur le chromosome 4 nécessitait son intervention en partenariat avec Pol IVb, alors la méthylation asymétrique de l'ADNr 5S devrait être différente dans les mutants *nrpd1a* et *nrpd1b* ; or ce n'est pas le cas. DDM1 quant à elle semble plutôt agir dans le phénomène de la méthylation de maintenance aux cotés de MET1. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* codant pour une quarantaine de protéines de type remodelage de la chromatine, le champ d'investigation est vaste.

Nous avons vu que l'action de Pol IVb sur le chromosome 4 est indépendante de RDR2, ce qui pourrait laisser supposer que cette action est indépendante des siRNA hétérochromatiques de 24 nt. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire de connaître l'impact de DCL3 ; des expériences de ce type sont en cours au laboratoire. Pourtant il est difficile d'écarter la piste des petits ARN car Pol IVb semble agir de manière très sélective sur le chromosome 4 et nécessite donc la présence d'un système de guidage. Une piste intéressante pourrait concerner les siRNA 21 et 22 nt, produits respectivement par DCL4 et DCL2 (DCL1 étant principalement impliquée dans la production des miRNA). En effet, dans de nombreuses études, la disparition des siRNA 24 nt laisse apparaître des siRNA 21 et 22 nt. Ce phénomène est très nettement observable pour les siRNA 5S dans les mutants *nrpd1a*, *nrpd1b* et *rdr2* dans les travaux de Pontier et al. (2005). Notre hypothèse serait donc que Pol IVb utilise ces siRNA pour diriger la compaction de l'ADNr 5S du chromosome 4. Ceci permettrait notamment d'expliquer pourquoi nous observons une décompaction en contexte *nrpd1b* et non dans *nrpd1a* : les siRNA sont présents dans les deux cas, mais l'effet n'est visible qu'en absence de Pol IVb. Une telle hypothèse pose la question de la protéine AGO utilisée dans un tel mécanisme. Nous pouvons exclure AGO4 puisque nous avons rapporté l'absence de décondensation de l'ADNr 5S dans le mutant correspondant (Vaillant et al., 2007).

Enfin, concernant le transcrit 5S-210, il reste deux points à éclaircir hormis la démonstration non équivoque de son implication dans la voie de l'ARN polymérase IV. Dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer les bornes exactes de ce transcrit puisque, a priori, nos observations ne se font pas sur le transcrit pleine

longueur. Nous avons tenté des expériences de 5' et 3' RACE-PCR qui n'ont malheureusement pas atteint le but escompté. Cette information faciliterait grandement l'éclaircissement du deuxième point : déterminer la polymérase en charge de la transcription initiale du brin sens de l'ARN 5S-210. Nos essais dans un système utilisant l'α-amanitine afin d'écarter les pistes ARN polymérase II et ARN polymérase III sont restés infructueux.

Références

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

Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11796-11801.

Allison, L.A., Romaniuk, P.J. and Bakken, A.H. (1991) RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during Xenopus oogenesis. *Dev Biol*, **144**, 129-144.

Archambault, J., Milne, C.A., Schappert, K.T., Baum, B., Friesen, J.D. and Segall, J. (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., Mette, M.F., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2004) The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol Biol*, **54**, 793-804.

Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2002a) RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16499-16506.

Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2002b) HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *Embo J*, **21**, 6832-6841.

Bartee, L., Malagnac, F. and Bender, J. (2001) Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev*, **15**, 1753-1758.

Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. and Aalen, R.B. (2001) The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4319-4333.

Baurle, I., Smith, L., Baulcombe, D.C. and Dean, C. (2007) Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science*, **318**, 109-112.

Bentley, D. (1999) Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 347-351.

Bertrand, C., Bergounioux, A., Domenichini, S., Delarue, M., Zhou, DX. (2003) Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J Biol Chem*, **278**, 28246-28251.

Bertrand, E., Houser-Scott, F., Kendall, A., Singer, R.H. and Engelke, D.R. (1998) Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev*, **12**, 2463-2468.

Besser, D., Gotz, F., Schulze-Forster, K., Wagner, H., Kroger, H. and Simon, D. (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.

Bestor, T. (1988) Structure of mammalian DNA methyltransferase as deduced from the inferred amino acid sequence and direct studies of the protein. *Biochem Soc Trans*, **16**, 944-947.

Betzel, C., Lorenz, S., Furste, J.P., Bald, R., Zhang, M., Schneider, T.R., Wilson, K.S. and Erdmann, V.A. (1994) Crystal structure of domain A of Thermus flavus 5S rRNA and the contribution of water molecules to its structure. *FEBS Lett*, **351**, 159-164.

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.

Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.

Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.

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.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, **123**, 1279-1291.

Boudonck, K., Dolan, L. and Shaw, P.J. (1999) The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*, **10**, 2297-2307.

Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. and Carroll, B.J. (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14741-14746.

Brow, D.A. (1987) In vitro transcripts of a yeast variant 5 S rRNA gene exhibit alterations in 3'-end processing and protein binding. *J Biol Chem*, **262**, 13959-13965.

Brzeski, J. and Jerzmanowski, A. (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem*, **278**, 823-828.

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.

Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. and Jacobsen, S.E. (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, **13**, 2212-2217.

Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002a) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16491-16498.

Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002b) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, **12**, 1138-1144.

Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S. and Jacobsen, S.E. (2000) Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4979-4984.

Carlson, M. (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 1-23.

Carty, S.M. and Greenleaf, A.L. (2002) Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 598-610.

Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, **303**, 1336.

Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell*, **110**, 33-42.

Cihlar, R.L. and Sypherd, P.S. (1980) The organization of the ribosomal RNA genes in the fungus Mucor racemosus. *Nucleic Acids Res*, **8**, 793-804.

Cioce, M. and Lamond, A.I. (2005) Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 105-131.

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.

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.

Condon, C., Squires, C. and Squires, C.L. (1995) Control of rRNA transcription in Escherichia coli. *Microbiol Rev*, **59**, 623-645.

Conesa, C., Swanson, R.N., Schultz, P., Oudet, P. and Sentenac, A. (1993) On the subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation of the yeast transcription factor TFIIIC/tau. *J Biol Chem*, **268**, 18047-18052.

Copenhaver, G.P. and Pikaard, C.S. (1996) Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana, suggesting local spreading of variants as the mode for gene homogenization during concerted evolution. *Plant J*, **9**, 273-282.

Corden, J.L. (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **15**, 383-387.

Dahmus, M.E. (1996) Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol*, **273**, 185-193.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.

Ding, B. and Itaya, A. (2007) Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 7-20.

Dobosy, J.R. and Selker, E.U. (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 721-727.

Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A. and Brimacombe, R. (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.

Drew, P.D., Nagle, J.W., Canning, R.D., Ozato, K., Biddison, W.E. and Becker, K.G. (1995) Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA. *Gene*, **159**, 215-218.

Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O. (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*, **37**, 1356-1360.

Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O. (2006) Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. *Nat Genet*, **38**, 258-263.

Ebbs, M.L., Bartee, L. and Bender, J. (2005) H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. *Mol Cell Biol*, **25**, 10507-10515.

Ebbs, M.L. and Bender, J. (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell*, **18**, 1166-1176.

El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. and Lagrange, T. (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev*, **21**, 2539-2544.

Ellis, T.H., Lee, D., Thomas, C.M., Simpson, P.R., Cleary, W.G., Newman, M.A. and Burcham, K.W. (1988) 5S rRNA genes in Pisum: sequence, long range and chromosomal organization. *Mol Gen Genet*, **214**, 333-342.

Engelke, D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S. and Roeder, R.G. (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell*, **19**, 717-728.

Finnegan, E.J., Brettell, R.I. and Dennis, E.S. (1993) The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. *Exs*, **64**, 218-261.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1996) Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8449-8454.

Flaus, A., Martin, D.M., Barton, G.J. and Owen-Hughes, T. (2006) Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res*, **34**, 2887-2905.

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.

Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. and Schubert, I. (2006) Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci*, **11**, 199-208.

Fulnecek, J., Matyasek, R., Kovarik, A. and Bezdek, M. (1998) Mapping of 5-methylcytosine residues in Nicotiana tabacum 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Mol Gen Genet*, **259**, 133-141.

Gaskins, C.J. and Hanas, J.S. (1990) Sequence variation in transcription factor IIIA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 2117-2123.

Gaskins, C.J., Smith, J.F., Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S. (1992) Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from Bufo americanus and Rana pipiens. *Gene*, **120**, 197-206.

Gibbons, R. (2006) Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis*, **1**, 15.

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.

Goldsbrough, P.B., Ellis, T.H. and Lomonossoff, G.P. (1982) Sequence variation and methylation of the flax 5S RNA genes. *Nucleic Acids Res*, **10**, 4501-4514.

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, **111**, 803-814.

Gottlob-McHugh, S.G., Levesque, M., MacKenzie, K., Olson, M., Yarosh, O. and Johnson, D.A. (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.

Greco-Stewart, V.S., Miron, P., Abrahem, A. and Pelchat, M. (2007) The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology*, **357**, 68-78.

Greenblatt, J. (1997) RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 310-319.

Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, **8**, 35-46.

Grummt, I. (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev*, **17**, 1691-1702.

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.

Hallenberg, C., Nederby Nielsen, J. and Frederiksen, S. (1994) Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene*, **142**, 291-295.

Hampsey, M. and Reinberg, D. (2003) Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell*, **113**, 429-432.

Hanas, J.S., Hocker, J.R., Cheng, Y.G., Lerner, M.R., Brackett, D.J., Lightfoot, S.A., Hanas, R.J., Madhusudhan, K.T. and Moreland, R.J. (2002) cDNA cloning, DNA binding, and evolution of mammalian transcription factor IIIA. *Gene*, **282**, 43-52.

Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik*, 762-818.

Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E. (2006) Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet*, **38**, 721-725.

Henikoff, S. and Comai, L. (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in Arabidopsis. *Genetics*, **149**, 307-318.

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.

Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev*, **14**, 1415-1429.

Holmberg, L. and Nygard, O. (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., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R. and Roeder, R.G. (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., Rife, J.P. and Moore, P.B. (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.

Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2006) Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *Embo J*, **25**, 2828-2836.

Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma*, **112**, 308-315.

Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556-560.

Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H. and Spector, D.L. (2004) From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*, **116**, 683-698.

Jarry, B. and Rosset, R. (1971) Heterogeneity of 5S RNA in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, **113**, 43-50.

Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M. and Schubert, I. (2003) Histone modifications in Arabidopsis- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J*, **33**, 471-480.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. and Richards, E.J. (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet*, **22**, 94-97.

Joazeiro, C.A., Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (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.

Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J. and Jacobsen, S.E. (2007) The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol*, **17**, 379-384.

Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D.C. (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol*, **11**, 747-757.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.

Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. and Richards, E.J. (2003) Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, **163**, 1109-1122.

Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Bohmdorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2008) A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, **40**, 670-675.

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.

Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2004) Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, **14**, 801-805.

Kapoor, A., Agius, F. and Zhu, J.K. (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett*, **579**, 5889-5898.

Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H. and Geiduschek, E.P. (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., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S. and Blanco, J.A. (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., Letts, G.A. and Geiduschek, E.P. (2001) The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB participates in two steps of promoter opening. *Embo J*, **20**, 2823-2834.

Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A. and Carrington, J.C. (2007) Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol*, **5**, e57.

Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. and Jin, H. (2006) A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18002-18007.

Kim, M., Canio, W., Kessler, S. and Sinha, N. (2001) Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, **293**, 287-289.

Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedea, E., Greenblatt, J.F. and Buratowski, S. (2004) The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature*, **432**, 517-522.

Kiss, A.M., Jady, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002) A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4643-4649.

Kundu, T.K., Wang, Z. and Roeder, R.G. (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.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A.H. (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, **13**, 1192-1200.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U. and Bestor, T.H. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873.

Li, C.F., Henderson, I.R., Song, L., Fedoroff, N., Lagrange, T. and Jacobsen, S.E. (2008) Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet*, **4**, e27.

Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S. and Jacobsen, S.E. (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell*, **126**, 93-106.

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E. (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077-2080.

Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., Khorasanizadeh, S. and Jacobsen, S.E. (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *Embo J*, **23**, 4286-4296.

Lu, C., Kulkarni, K., Souret, F.F., MuthuValliappan, R., Tej, S.S., Poethig, R.S., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., Wang, W., Green, P.J. and Meyers, B.C. (2006) MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res*, **16**, 1276-1288.

Mao, X. and Darby, M.K. (1993) A position-dependent transcription-activating domain in TFIIIA. *Mol Cell Biol*, **13**, 7496-7506.

Mascia, P.N., Rubenstein, I., Phillips, R.L., Wang, A.S. and Xiang, L.Z. (1981) Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. *Gene*, **15**, 7-20.

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., 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.

Mathieu, O. (2003) Implication de mécanismes épigénétiques dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr 5S chez Arabidopsis thaliana. *Thèse, Université Blaise Pascal*.

Mathieu, O., Picard, G. and Tourmente, S. (2002) Methylation of a euchromatin-heterochromatin transition region in Arabidopsis thaliana chromosome 5 left arm. *Chromosome Res*, **10**, 455-466.

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.

Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. and Matzke, A.J. (2006) RNA-directed DNA methylation and Pol IVb in Arabidopsis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 449-459.

May, B.P., Lippman, Z.B., Fang, Y., Spector, D.L. and Martienssen, R.A. (2005) Differential regulation of strand-specific transcripts from Arabidopsis centromeric satellite repeats. *PLoS Genet*, **1**, e79.

Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J*, **19**, 5194-5201.

Miller, J., McLachlan, A.D. and Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. *Embo J*, **4**, 1609-1614.

Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6853-6858.

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

Mosher, R.A., Schwach, F., Studholme, D. and Baulcombe, D.C. (2008) PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3145-3150.

Murata, M., Heslop-Harrison, J.S. and Motoyoshi, F. (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.

Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T. and Yanagisawa, J. (2008) Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, **133**, 627-639.

Nelson, D.W., Linning, R.M., Davison, P.J. and Honda, B.M. (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.

Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.

Nielsen, J.N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sorensen, P.D. and Lomholt, B. (1993) Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3631-3636.

Nolte, R.T., Conlin, R.M., Harrison, S.C. and Brown, R.S. (1998) Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2938-2943.

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.

Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. (2008) Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol*, **67**, 671-681.

Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A.M., Gustafsson, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, **3**, 109-118.

Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, **30**, 5036-5055.

Parsons, M.C. and Weil, P.A. (1992) Cloning of TFC1, the Saccharomyces cerevisiae gene encoding the 95-kDa subunit of transcription factor TFIIIC. *J Biol Chem*, **267**, 2894-2901.

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

Pederson, T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3871-3876.

Pelissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sanger, H.L. and Wassenegger, M. (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.

Penterman, J., Uzawa, R. and Fischer, R.L. (2007) Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **145**, 1549-1557.

Peterson, R.C., Doering, J.L. and Brown, D.D. (1980) Characterization of two xenopus somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. *Cell*, **20**, 131-141.

Philippsen, P., Thomas, M., Kramer, R.A. and Davis, R.W. (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.

Pieler, T., Hamm, J. and Roeder, R.G. (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.

Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. and Wierzbicki, A.T. (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci*, **13**, 390-397.

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.

Platero, J.S., Hartnett, T. and Eissenberg, J.C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J*, **14**, 3977-3986.

Polakowski, N. and Paule, M.R. (2002) Purification and characterization of transcription factor IIIA from Acanthamoeba castellanii. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1977-1984.

Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. and Pikaard, C.S. (2006) The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*, **126**, 79-92.

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.

Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., Earley, K., Lawrence, R.J., Pikaard, C.S., Murfett, J., Furner, I., Vaucheret, H. and Mittelsten Scheid, O. (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.

Probst, A.V., Santos, F., Reik, W., Almouzni, G. and Dean, W. (2007) Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma*, **116**, 403-415.

Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J. and Hannon, G.J. (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, **443**, 1008-1012.

Rafalski, J.A., Wiewiorowski, M. and Soll, D. (1982) Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (Lupinus luteus). *Nucleic Acids Res*, **10**, 7635-7642.

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D.P. (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev*, **20**, 3407-3425.

Ramsahoye, B.H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P. and Jaenisch, R. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5237-5242.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.

Ro-Choi, T.S., Reddy, R., Henning, D. and Busch, H. (1971) 5S RNA 3 , a new nucleus-specific 5S RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **44**, 963-972.

Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. and Dellaporta, S.L. (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science*, **273**, 654-657.

Sakonju, S. and Brown, D.D. (1982) Contact points between a positive transcription factor and the Xenopus 5S RNA gene. *Cell*, **31**, 395-405.

Santoro, R. and Grummt, I. (2005) Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 2539-2546.

Santoro, R., Li, J. and Grummt, I. (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*, **32**, 393-396.

Santos, F., Peters, A.H., Otte, A.P., Reik, W. and Dean, W. (2005) Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol*, **280**, 225-236.

Schneeberger, R.G., Creissen, G.P. and Cullis, C.A. (1989) Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, Linum usitatissimum. *Gene*, **83**, 75-84.

Schramm, L. and Hernandez, N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev*, **16**, 2593-2620.

Schulman, D.B. and Setzer, D.R. (2003) Functional analysis of the novel C-terminal domains of S pombe transcription factor IIIA. *J Mol Biol*, **331**, 321-330.

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

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

Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*, **53**, 947-958.

Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. and Kooter, J.M. (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol*, **11**, 436-440.

Sims, M.A., Doering, J.L. and Hoyle, H.D. (1983) DNA methylation patterns in the 5S DNAs of Xenopus laevis. *Nucleic Acids Res*, **11**, 277-290.

Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S. and Baulcombe, D.C. (2007) An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 1507-1521.

Soppe, W.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M. and Peeters, A.J. (2000) The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell*, **6**, 791-802.

Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F. (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *Embo J*, **21**, 6549-6559.

Sorensen, P.D. and Frederiksen, S. (1991) Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4147-4151.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.

Swiezewski, S., Crevillen, P., Liu, F., Ecker, J.R., Jerzmanowski, A. and Dean, C. (2007) Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of

the Arabidopsis gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3633-3638.

Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A. and Barciszewski, J. (2003) 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem J*, **371**, 641-651.

Tessadori, F., Chupeau, M.C., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., van Driel, R., Fransz, P. and Gaudin, V. (2007) Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated Arabidopsis cells. *J Cell Sci*, **120**, 1200-1208.

Till, S. and Ladurner, A.G. (2007) RNA Pol IV plays catch with Argonaute 4. *Cell*, **131**, 643-645.

Turner, B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, **22**, 836-845.

Tutois, S., Cloix, C., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Lafleuriel, J., Picard, G. and Tourmente, S. (1999) Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of Arabidopsis thaliana. *Chromosome Res*, **7**, 143-156.

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.

Ueda, K., Kinoshita, Y., Xu, Z.J., Ide, N., Ono, M., Akahori, Y., Tanaka, I. and Inoue, M. (2000) Unusual core histones specifically expressed in male gametic cells of Lilium longiflorum. *Chromosoma*, **108**, 491-500.

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.

Vaughn, M.W. and Martienssen, R.A. (2005) Finding the right template: RNA Pol IV, a plant-specific RNA polymerase. *Mol Cell*, **17**, 754-756.

Venkateswarlu, K., Lee, S.W. and Nazar, R.N. (1991) Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*, **105**, 249-254.

Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A. and Richards, E.J. (1993) Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science*, **260**, 1926-1928.

Wagner, I. and Capesius, I. (1981) Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta*, **654**, 52-56.

Wang, Z. and Roeder, R.G. (1996) TFIIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. *Mol Cell Biol*, **16**, 6841-6850.

Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H.L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.

Wegel, E., Vallejos, R.H., Christou, P., Stoger, E. and Shaw, P. (2005) Large-scale chromatin decondensation induced in a developmentally activated transgene locus. *J Cell Sci*, **118**, 1021-1031.

Wildeman, A.G. and Nazar, R.N. (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.

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.

Woychik, N.A. and Hampsey, M. (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, **108**, 453-463.

Wyszko, E. and Barciszewska, M. (1997) Purification and characterization of transcription factor IIIA from higher plants. *Eur J Biochem*, **249**, 107-112.

Wyszko, E., Radlowski, M., Bartkowiak, S. and Barciszewska, M.Z. (1997) Maize TF IIIA--the first transcription factor IIIA from monocotyledons. Purification and properties. *Acta Biochim Pol*, **44**, 579-589.

Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Pennell, R.I. and Fischer, R.L. (2003) Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev Cell*, **5**, 891-901.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.

Xiong, Y. and Sundaralingam, M. (2000) Two crystal forms of helix II of Xenopus laevis 5S rRNA with a cytosine bulge. *Rna*, **6**, 1316-1324.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. and Chen, X. (2006) HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*, **34**, 667-675.

Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, **13**, 335-340.

Yoshinaga, S.K., Boulanger, P.A. and Berk, A.J. (1987) Resolution of human transcription factor TFIIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3585-3589.

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.

Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S. and Zhu, J.K. (2008) ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature*, **455**, 1259-1262.

Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2007) Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo J*, **26**, 1691-1701.

Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.

Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, **14**, 1214-1220.

Zluvova, J., Janousek, B. and Vyskot, B. (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J Exp Bot*, **52**, 2265-2273.

Annexes

Durant ma thèse, j'ai pu apporter ma contribution à deux études ayant fait l'objet de publications.

L'article n°4 rend compte de travaux effectués dans notre équipe. Ce dernier montre qu'en conditions de cultures différentes (serre ou chambre de culture) la plante présente des patrons de méthylation, d'expression et de structure chromatinienne de l'ADNr 5S différents. Cet article constitue un exemple de la plasticité de la chromatine de l'ADNr 5S en réponse à des contraintes environnementales.

L'article n°5, fruit d'une collaboration avec l'équipe de J. Sáez-Vásquez (Université de Perpignan), traite de la caractérisation de la protéine AtNUC-L1. Cette étude montre l'implication de AtNUC-L1 dans l'organisation chromatinienne de l'ADNr 45S et dans l'accumulation des précurseurs de l'ARNr 45S.

Article n°4 :

« Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in Arabidopsis »

Isabelle Vaillant, Sylvie Tutois, Zuzana Jasencakova, **Julien Douet**, Ingo Schubert and Sylvette Tourmente

Plant Journal**,** 2008, 54, 299-309.

The Plant Journal (2008) **54**, 299–309 doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03413.x

Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in Arabidopsis

Isabelle Vaillant[1,†,§], Sylvie Tutois[1,§], Zuzana Jasencakova[2,‡], Julien Douet[1], Ingo Schubert[2] and Sylvette Tourmente[1,*]
[1]*Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 GReD, INSERM, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France, and*
[2]*Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany*

Received 12 November 2007; revised 20 December 2007; accepted 21 December 2007.
*For correspondence (fax (33) 4 73 40 77 77; e-mail sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr).
†Present address: University of Geneva, Laboratory of Plant Genetics Sciences III, 30 Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4, Switzerland.
‡Present address: c/o Valerio Orlando, Dulbecco Telethon Institute, Institute of Genetics and Biophysics CNR, Epigenetics and Genome Reprogramming laboratory, Via Pietro Castellino 111, 80131 Naples, Italy.
§Both contributed equivalently.

Summary

5S ribosomal DNA (5S rDNA) is organized in tandem repeats on chromosomes 3, 4 and 5 in *Arabidopsis thaliana*. One part of the 5S rDNA is located within the heterochromatic chromocenters, and the other fraction forms loops with euchromatic features that emanate from the chromocenters. We investigated whether the *A. thaliana* heterochromatin, and particularly the 5S rDNA, is modified when changing the culture conditions (cultivation in growth chamber versus greenhouse). Nuclei from challenged tissues displayed larger total, as well as 5S rDNA, heterochromatic fractions, and the DNA methyltransferase mutants *met1* and *cmt3* had different impacts in Arabidopsis. The enlarged fraction of heterochromatic 5S rDNA was observed, together with the reversal of the silencing of some 5S rRNA genes known as minor genes. We observed hypermethylation at CATG sites, and a concomitant DNA hypomethylation at CG/CXG sites in 5S rDNA. Our results show that the asymmetrical hypermethylation is correlated with the ageing of the plants, whereas hypomethylation results from the growth chamber/culture conditions. In spite of severely reduced DNA methylation, the *met1* mutant revealed no increase in minor 5S rRNA transcripts in these conditions. The increasing proportion of cytosines in asymmetrical contexts during transition from the euchromatic to the heterochromatic state in the 5S rDNA array suggests that 5S rDNA units are differently affected by the (hypo and hyper)methylation patterns along the 5S rDNA locus. This might explain the different behaviour of 5S rDNA subpopulations inside a 5S array in terms of chromatin compaction and expression, i.e. some 5S rRNA genes would become derepressed, whereas others would join the heterochromatic fraction.

Keywords: 5S rDNA, heterochromatin, culture conditions, methylation, *Arabidopsis thaliana*.

Introduction

Arabidopsis thaliana contains about 1000 tandemly arranged copies of 5S ribosomal RNA (5S rRNA) genes per haploid genome (Campell *et al.*, 1992). In the accession Landsberg *erecta* (*Ler*), these repeats are clustered at four loci within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of the chromosome; Fransz *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 1997). In interphase nuclei, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) revealed that a fraction of 5S rDNA is located within the heterochromatic chromocenters, whereas the other fraction forms loops with euchromatin features that emanate from chromocenters, and were proposed to contain the transcribed 5S rRNA genes (Mathieu *et al.*, 2003). Transcriptionally active 5S rDNA units encoding the major and minor 5S rRNA transcripts (differing from each other by one or two base substitutions) are only found on chromosome 4, and in the large locus of chromosome 5 (Cloix *et al.*, 2002; Tutois *et al.*, 2002).

Our previous results showed that in wild-type (WT) mature leaves either from *Ler*, or from the Columbia (Col) accession where 5S rDNA is highly methylated (Mathieu *et al.*, 2002b), only genes encoding major 5S rRNA are

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd

transcribed (Mathieu *et al.*, 2003). Hypomethylation of 5S rDNA at CG or CNG was correlated with the derepression of minor 5S rRNA genes (Mathieu *et al.*, 2003; Vaillant *et al.*, 2007a,b). Repression of 5S rRNA minor genes depends additionally on a methylation-independent (MOM) pathway (Vaillant *et al.*, 2006), which has been hypothesized to reinforce the methylation-based repression, and to prevent a rapid epigenetic deregulation in plants with DNA methylation deficiencies (Mittelsten Scheid *et al.*, 2002).

DNA methylation is an epigenetic mark in plants, most animals and in fungi (Jaenisch and Bird, 2003; Martienssen and Colot, 2001; Matzke and Birchler, 2005; Rangwala and Richards, 2004; Tariq and Paszkowski, 2004; Zilberman and Henikoff, 2004). In plants, DNA cytosine methylation occurs in any sequence contexts, i.e. CG, CXG and CXX (where X can be A, T or C). The Dnmt3 subfamily of DNA methyltransferases, DRM1 and DRM2, functions in *de novo* methylation. Maintenance methylation at the CG sites is carried out by the Dnmt1 ortholog, METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), and CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) is responsible for CXG methylation (Chan *et al.*, 2005). 5S rDNA was shown to be methylated in all contexts, symmetrical (CG and CXG) or non-symmetrical (CXX) (Mathieu *et al.*, 2002b), as is characteristic of (peri)centromeric sequences (Luo and Preuss, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Recent results showed that numerous loci scattered throughout the genome represent sites where two opposing pathways, DNA methylation and demethylation, converge (Penterman *et al.*, 2007). This dynamic control may be important in keeping the plant epigenome plastic so that it can efficiently respond to developmental and environmental cues (Zhu *et al.*, 2007). Minor 5S rRNA genes are expressed in some tissues (Mathieu *et al.*, 2003), or in DNA methyltransferase mutants (Vaillant *et al.*, 2007), and could represent a plastic fraction of 5S rDNA able to respond to environmental changes.

Current observations revealed that plants grown in agar medium in a growth chamber display an accelerated development compared with their homologs grown in soil in a greenhouse. Apart from transposable elements, few reports concern the behaviour of heterochromatic sequences in relation to environmental conditions (for a review, see Madlung and Comai, 2004; Grant-Downton and Dickinson, 2006), although some heterochromatic sequences, such as the rRNA genes that are needed for ribosome synthesis, serve an important role.

Here, we addressed the question of whether the growth chamber culture conditions affect nuclear processes such as chromatin compaction and transcription of the pericentromeric tandemly-repeated 5S rDNA family. To investigate this, we analyzed the expression of 5S rRNA genes (including the proportion of minor 5S rRNAs) and their chromatin compaction under two growing regimes (cultivation in a growth chamber versus a greenhouse). In parallel, 5S rDNA chromatin compaction, methylation and transcription were analyzed for DNA methyltransferase mutants known to affect methylation and expression of repeated sequences. We found that derepression of minor 5S rRNA genes and altered proportions of heterochromatic versus euchromatic 5S rDNA fractions occur when environmental conditions are changed.

Results

Plants grown in a growth chamber (GC plants) on MS medium display an accelerated development compared with plants grown on soil in a greenhouse (GH plants). GC plants at 3 weeks of age are smaller and flower earlier compared with 3-week-old GH plants (Figure 1).

Nuclei of plants grown in a growth chamber display a higher heterochromatin content than plants grown in a greenhouse

After 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of WT nuclei from the accessions Ler and Col, conspicuous heterochromatic chromocenters can be distinguished. We quantified the heterochromatin content (chromocenter fraction) by measuring the area and staining intensity of the chromocenter, in relation to that of the entire nucleus in leaf nuclei of 3-week-old plants grown under both conditions (GC and GH). The chromocenter fractions of WT GC plants, which display an accelerated development, were significantly higher (16.99% versus 13.43%, $P < 0.025$ for Col; 12.46% versus 10.47%, $P < 0.005$ for Ler) in comparison with GH plants (Figure 2a).

Previous studies have reported an increase of heterochromatin content during seedling differentiation (Mathieu *et al.*, 2003) and the development of rosette leaves (Tessadori *et al.*, 2004). To confirm that the increase of the chromocenter fraction is related to plant development, we quantified the heterochromatin content in 5-week-old GH plants. The

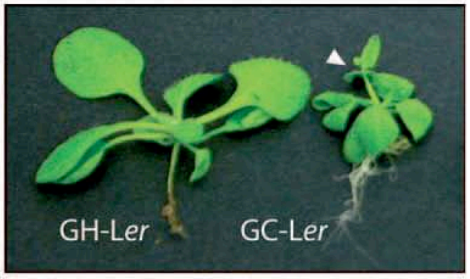


Figure 1. Three-week-old *Ler* plants, grown in a greenhouse (GH-*Ler*) or in a growth chamber (GC-*Ler*). The white arrowhead indicates a flower on the GC-*Ler* plant.

© 2008 The Authors

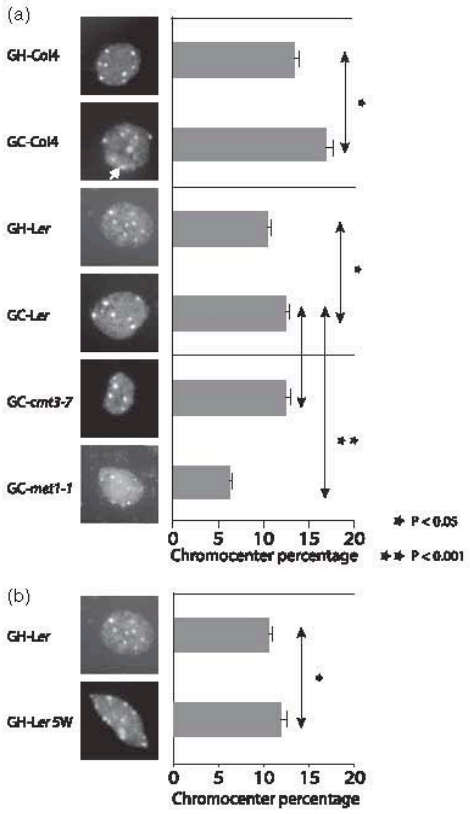


Figure 2. The heterochromatin content is increased in growth chamber (GC)-grown plants, except for *met1-1*.
(a) Representative 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained leaf nuclei of 3-week-old wild-type (WT) plants (Landsberg *erecta* and Columbia), and *met1-1* and *cmt3-7* mutants, grown in either a greenhouse (GH) or growth chamber (GC) (left). The white arrow points to a DAPI-stained heterochromatic chromocenter.
(b) Representative DAPI-stained leaf nuclei of 3- and 5-week-old *Ler* plants grown in a greenhouse (GH).
Chromocenter fractions, derived from measurements from 46–58 nuclei are represented on the bar graph (right). The standard error of the mean is indicated on each bar.
Asterisks indicate values significantly different (Kolmogorov–Smirnov test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.001$) from the GH value for growth-chamber grown (GC) Col, GC-*Ler* and for GH-5w *Ler* plants; and from the GC *Ler* value for GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* mutants.

chromocenter fraction of 5-week-old GH plants was significantly higher compared with their 3-week-old homologs (12.09% versus 10.47%, $P < 0.05$; Figure 2b). We had to ensure that all the plants used in this study were outside the floral transition, as Tessadori *et al.* (2007) demonstrated a transient reduction of heterochromatin over a short period (2–4 days) that corresponded specifically with the floral transition.

Chromocenters are rich in methylated DNA (Fransz *et al.*, 2002), and a 5-methylcytosine imprint is required to maintain a chromocenter state (Soppe *et al.*, 2002). As MET1 and CMT3 maintain DNA methylation at the CG and CXG sites, respectively (Bartee *et al.*, 2001; Finnegan and Kovac, 2000; Lindroth *et al.*, 2001; Lippman *et al.*, 2003; Tompa *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2005), we examined the chromocenter fraction in both mutants. Nuclei of the GC-*cmt3-7* mutant displayed a similar heterochromatin content as GC-WT nuclei (12.52% versus 12.46%, $P > 0.1$; Figure 2a). This shows that heterochromatin compaction does not depend on CMT3-mediated CXG methylation. The heterochromatin content was lower in GC-*met1-1* nuclei compared with WT GC-*Ler* nuclei (6.29% versus 12.46%; $P < 0.001$). *met1-1* nuclei have roughly 50% less heterochromatin than the other genotypes under GC conditions (Figure 2a).

In agreement with previous results (Fransz *et al.*, 2006), heterochromatin compaction is mainly under the control of MET1-mediated CG methylation, but not of CMT3-mediated CXG methylation.

MET1- and CMT3-mediated methylation is necessary for 5S rDNA compaction when plants were grown in growth chambers

To see whether the heterochromatic fraction of 5S rDNA is increased in GC plants, as is the total heterochromatin content, FISH with labeled 5S rDNA was performed on leaf nuclei from 3-week-old GC and GH plants. A significant increase of the heterochromatic 5S rDNA fraction co-localizing with chromocenters was found in *Ler* nuclei from GC plants (72%), compared with those of GH plants, where 33% of the 5S rDNA signals were quantified in the chromocenters (χ^2, $P < 0.001$; Figure 3). Similar results were obtained with Col plants (71% versus 35%, χ^2, $P < 0.001$, not shown).

These results show an increased chromatin compaction of 5S rDNA in both GC-Col and GC-*Ler* plants compared with GH plants.

The relation between heterochromatin increase and plant development was checked for 5S rDNA. Five-week-old GH plants contained a 5S rDNA heterochromatic fraction significantly larger than 3-week-old GH plants (57% versus 33%, χ^2, $P < 0.001$, not shown).

To test the influence of MET1 and CMT3 on 5S rDNA chromatin compaction in GC plants, we used *met1-1* and *cmt3-7* mutants. As shown in Figure 3, GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* nuclei harbored a smaller heterochromatic 5S rDNA fraction compared with GC-*Ler* plants (39 and 25%, significantly different from 72% in GC-*Ler* plants, χ^2, $P < 0.001$).

These results show that both MET1- and CMT3-mediated methylation is necessary for 5S rDNA compaction in these growth conditions.

© 2008 The Authors

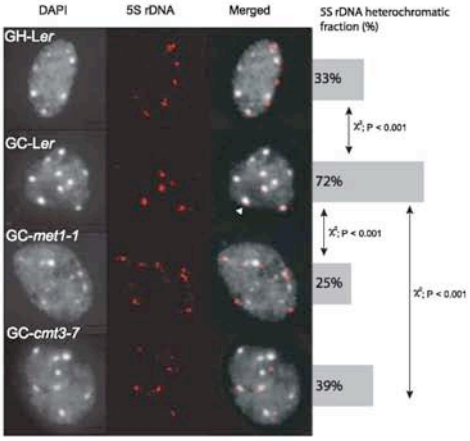


Figure 3. Proportion of 5S rDNA inside the chromocenters.
Counterstaining with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; left); fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a 5S rDNA probe (red; middle); and both images merged (right) on nuclei from wild-type (WT), *met1-1* and *cmt3-7* plants (Landsberg *erecta* background). Heterochromatic 5S rDNA fractions, derived from measurements from 50–90 nuclei are represented on the bar graph (far right). A significant increase of the heterochromatic 5S rDNA fraction co-localizing with chromocenters (indicated by the white arrow) is observed in growth-chamber grown (GC)-L*er* nuclei [72% versus 33% for the glasshouse-grown (GH)-L*er* reference, χ^2, $P < 0.001$). The GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* nuclei harbored a smaller heterochromatic 5S rDNA fraction compared with GC-L*er* plants (39% and 25%, significantly different from 72% in GC-L*er* plants, χ^2, $P < 0.001$).

Hypomethylation at symmetrical sites and hypermethylation at asymmetrical sites may occur concomitantly in 5S rDNA

Plants grown in growth chambers displayed 5S rDNA asymmetrical hypermethylation Methylation and compaction of highly repeated sequences are often correlated, and 5S rDNA was previously shown to be methylated in all contexts (CG, CXG or CXX; Mathieu *et al.*, 2002b,a), as is characteristic of (peri)centromeric sequences (Luo and Preuss, 2003; Zhang *et al.*, 2006). We therefore assessed whether the 5S rDNA methylation was increased in the WT GC-grown plants in which we found a larger 5S rDNA heterochromatic fraction (Figure 3). The 5S rDNA methylation was studied by digestion with *Hpa*II (inhibited by methylation of either cytosine in the CCGG restriction site, corresponding to symmetrical contexts CG and CXG), *Msp*I (inhibited by methylation of the outer cytosine in the CXG symmetrical context of the CCGG restriction site) and by *Nla*III (inhibited by methylation of the cytosine in the CATG asymmetrical context). The methylation frequency of cytosine is inversely proportional to the intensity of the 0.5-kb band, which corresponds to monomeric units of 5S rDNA. The *Hpa*II and *Msp*I digestions revealed a significant CG/CXG symmetrical hypomethylation in GC-grown L*er* plants (Figure 4a), compared with GH-L*er* plants, despite the higher compaction of 5S rDNA that we observed by FISH (Figure 3). Opposite results were obtained with *Nla*III, which revealed an increased methylation at asymmetrical (CATG) sites, illustrated by a ladder of 5S rDNA fragments in GC plants. These results show that both hypomethylation at symmetrical (CG/CXG) and hypermethylation at asymmetrical (CATG) sites occur concomitantly at 5S rDNA. Testing the impact on other sequences, similar results (i.e. symmetrical hypomethylation and increased methylation at asymmetrical sites) were obtained for the centromeric tandemly-repeated 180-bp repeats (Figure S1).

These results suggest that hypermethylation at asymmetrical (CATG) sites drives the increased compaction of 5S rDNA in WT GC plants.

Hypermethylation results from ageing; hypomethylation results from growth-chamber culture conditions. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development (Finnegan *et al.*, 1998; Ruiz-Garcia *et al.*, 2005). If the asymmetrical hypermethylation reflects the ageing of the 3-week-old GC plants (Palmgren *et al.*, 1991; Richards, 1997; Ruiz-Garcia *et al.*, 2005), the same methylation pattern is expected in 5-week-old GH plants.

For this purpose we studied the methylation pattern of the 5S rDNA and centromeric tandemly-repeated 180-bp repeats, from L*er* plants grown for 3 and 5 weeks in a greenhouse. Indeed, asymmetrical hypermethylation was detected by *Nla*III digestion for 5S rDNA in 5-week-old plants compared with 3-week-old plants, all grown in a greenhouse, whereas no obvious difference was obtained for the 180-bp repeats. No significant change of the symmetrical methylation pattern was observed with *Hpa*II digestion (Figure 5a,b).

These results show that the asymmetrical hypermethylation of the 5S rDNA pericentromeric sequences is correlated with the ageing of the plants, whereas hypomethylation results from the GC culture conditions. (This last point was strengthened by the observation that L*er* plants grown for 3 weeks in a growth chamber, but on soil, are hypomethylated at CG/CNG but not at CXX 5S rDNA sites, not shown.)

Methylation pattern of 5S rDNA in cmt3-7 *and* met1-1 *mutants.* The 5S rDNA methylation pattern was studied in the GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* mutants affected in the 5S rDNA chromatin compaction. The GC-*cmt3-7* mutant exhibited a large decrease of symmetrical (CXG) methylation, revealed by *Msp*I (CMT3 is a CXG-specific DNA methyltransferase), compared with GC-L*er* plants, and a comparable asymmetrical methylation was detected by *Nla*III digestion (Figure 4b). In the GC-*met1-1* mutant, the symmetrical (CG/CXG) methylation revealed by *Hpa*II was lower compared with GC-L*er* plants, and the *Nla*III digestion

© 2008 The Authors

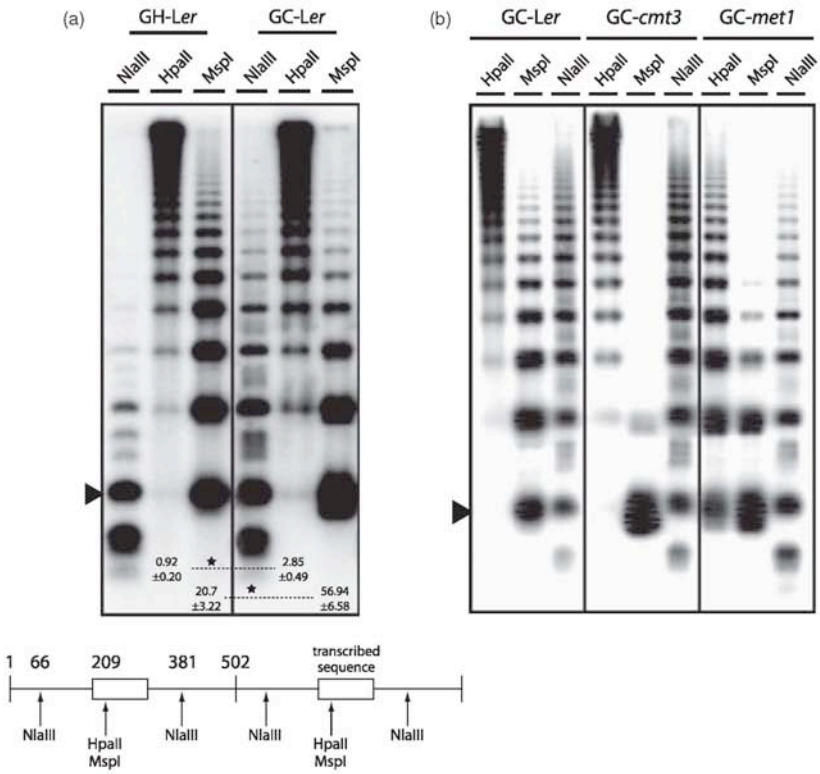


Figure 4. 5S rDNA methylation in growth-chamber grown (GC) versus glasshouse-grown (GH) plants.
(a) Genomic DNA prepared from GH-L*er* and GC-L*er* plants, digested by *Nla*III, *Hpa*II and *Msp*I, and probed by 5S rDNA on gel blots.
5S rDNA methylation was estimated by quantifying the intensity of the 0.5-kb band (with the whole-line radioactivity), which corresponds to monomeric units of 5S rDNA.
*The *Hpa*II and *Msp*I digestions revealed a significant CG/CXG symmetrical hypomethylation in GC-grown L*er* plants compared with GH-L*er* plants (*Hpa*II, 2.85 ± 0.49 in GC-L*er*, significantly different from 0.92 ± 0.2 in GH-L*er*, Mann–Whitney test, $P < 0.01$; *Msp*I, 56.94 ± 6.58 in GC-L*er*, significantly different from 20.7 ± 3.22 in GH-L*er*, Mann–Whitney test, $P < 0.01$).
A schematic representation of two tandemly-arrayed 5S rDNA units with the positions (in bp) of the *Hpa*II/*Msp*I and *Nla*III sites is given.
(b) Genomic DNA prepared from GC-L*er*, *met1-1* and *cmt3-7* plants digested by *Hpa*II, *Msp*I and *Nla*III and probed by 5S rDNA.
The arrowhead indicates the 0.5-kb monomeric band.

revealed the presence of asymmetrical methylation (Figure 4b).

In both mutants, the GC conditions were not associated with an increased compaction of 5S rDNA (Figure 3). These results confirm that both MET1- and CMT3-mediated methylation is necessary for 5S rDNA compaction in these growth conditions.

Minor 5S rDNA transcription is released in all but met1-1 *nuclei of plants grown under growth-chamber conditions*

As GC culture conditions affect DNA methylation and chromatin compaction of (peri)centromeric sequences, we addressed the question of whether they also affect the transcription of the pericentromeric 5S rRNA genes.

We previously showed that only major 5S rRNA genes were transcribed in 3-week-old GH-L*er* plants (Mathieu *et al.*, 2003). Hypomethylation of 5S rDNA at symmetrical (CG or CXG) sites was correlated with derepression of minor 5S rRNA genes (Mathieu *et al.*, 2003; Vaillant *et al.*, 2007).

We therefore investigated whether minor 5S transcripts occurred in the GC plants characterized by a demethylation at symmetrical (CG/CXG) sites. Three or four RNA extractions were performed from a pool of plants for each genotype, and 5S rRNA-specific RT-PCR products were sequenced. The transcription release of minor 5S rRNA

© 2008 The Authors

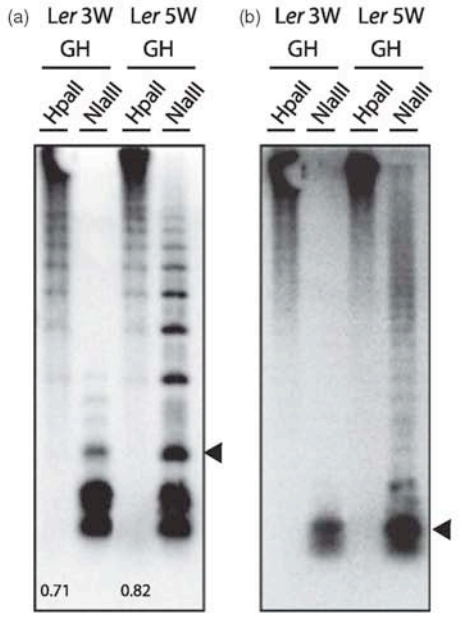


Figure 5. Asymmetrical methylation correlates with ageing.
Genomic DNA prepared from 3- and 5-week-old GH-L*er* plants, digested by *Hpa*II or *Nla*III and probed by 5S rDNA (a) and 180-bp repeats (b) on gel blots. Arrowheads indicate the 0.5-kb and 0.180-kb monomeric bands, for the 5S rDNA and the 180-bp repeats, respectively.
(a) 5S rDNA methylation was estimated by quantifying the intensity of the 0.5-kb band (with the whole-line radioactivity), which corresponds to monomeric units of 5S rDNA. The symmetrical methylation revealed by *Hpa*II digestion is not significatively different (Mann–Whitney test, $P > 0.5$) in 3- and 5-week-old GH-L*er* plants.

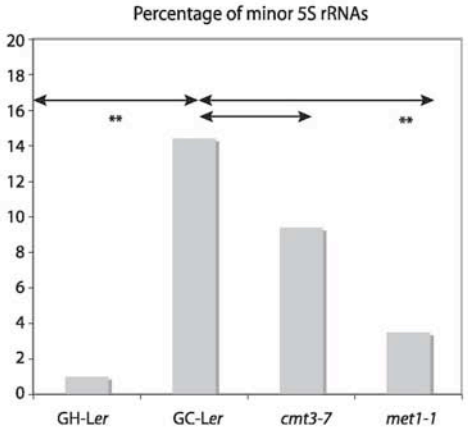


Figure 6. Percentage of minor 5S rRNAs.
Asteriks denote significant differences between the glasshouse-grown (GH)-L*er* value for growth-chamber grown (GC)-L*er* plants ($**P = 0.01$; Fisher's exact test) and the GC-L*er* value for the GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* mutants. A total of 96, 92, 64 and 85 5S cDNA clones were sequenced for GH-L*er*, GC-L*er*, GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1*, respectively.

genes was observed for GC-grown L*er* plants ($P < 0.01$, GH-L*er* value used as a reference; Figure 6), correlating with hypomethylation of 5S rDNA at CG/CXG sites. A derepression of minor 5S rRNA genes was also observed for GC-grown *cmt3-7* plants (Figure 6).

To exclude the possibility that the derepression of minor 5S rRNA genes results from asymmetrical hypermethylation, we analyzed the 5S rRNA in 5-week-old GH-L*er* plants that display an asymmetrical hypermethylation (and no symmetrical hypomethylation), compared with 3-week-old GH-L*er* plants (Figure 5). RNA extractions, followed by sequencing of 5S rRNA-specific RT-PCR products, revealed no significant increase in minor 5S rRNA transcripts in 5-week-old GH-L*er* plants, compared with 3-week-old GH-L*er* plants (three minor 5S rRNA for a total of 66 clones in 5-week-old GH-L*er* plants, not significantly different from one minor 5S rRNA for 60 clones in 3-week-old GH-L*er* plants; Fisher's exact test, $P > 0.05$). This shows that asymmetrical hypermethylation is not correlated with the derepression of minor 5S rRNA genes.

Surprisingly, no release of minor 5S rRNA genes was observed in *met1-1* mutants (Figure 6), despite a strong hypomethylation at symmetrical (CG) sites. *met1-1* nuclei exhibited the smallest fraction of 5S rDNA in heterochromatin (Figure 3), and consequently exhibited the largest 5S rDNA chromatin loops, which are expected to contain the active 5S rRNA genes. This means that under conditions where 5S rDNA is largely hypomethylated, some mechanisms counteract the expected release of the silencing of minor 5S genes, a situation already observed in previous studies (see Discussion).

The total level of 5S rRNA increases under growth-chamber conditions

As GC plants displayed accelerated development, we were interested in the quantitative transcription of 5S genes. RNA gel blot analysis revealed an increased total level of 5S rRNA for all GC-grown genotypes (Figure 7), probably needed for the accelerated development or ageing of these plants. The GC-grown plants (L*er*, *cmt3-7* and *met1-1*) accumulated the same quantity of 5S rRNA, independent of the presence of minor 5S rRNA. Therefore these results support our previous conclusions that the absence or presence of minor 5S rRNA does not correlate with the total level of 5S rRNA. They also suggest that WT and mutant plants might be able to satisfy the appropriate ribosome production.

© 2008 The Authors

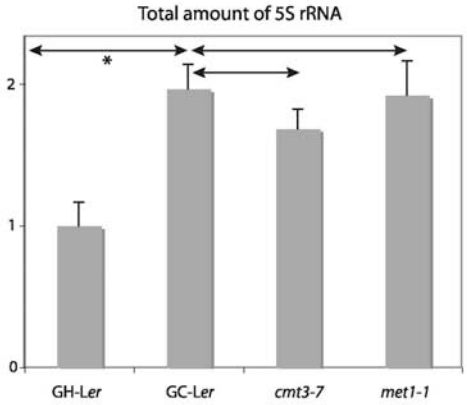


Figure 7. 5S rRNA levels.
5S rRNA levels in glasshouse-grown (GH)-L*er*, growth-chamber grown (GC)-L*er*, GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* plants. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe. RNA quantities were normalized using a RAN protein probe (Haizel *et al.*, 1997), and 5S rRNA levels were quantified accordingly. The results of at least three independent experiments are represented in the histogram; a pool of plants was used for each extraction.
The asterisk denotes significant differences (*P = 0.01; Mann–Whitney test) to the GH-L*er* reference value (which is arbitrarily fixed as 1) for GC-L*er* plants, and to the GC-L*er* value for GC-*cmt3-7* and GC-*met1-1* mutants.

The relative proportion of cytosines in asymmetrical context within the 5S rDNA array of chromosome 5 increases towards the centromere

The concomitant presence of symmetrical hypomethylation and asymmetrical hypermethylation suggested that 5S rDNA units were differently affected by the methylation changes. 5mC residues are subject to transition mutations, as spontaneous deamination of 5mC leading to thymine occurs frequently. It results in CXX depletion and replacement of CG and CXG by cytosines in an asymmetrical context (5′-CG becomes 5′-TG by deamination, which is a 5′-CA site on the other strand). Previously, we sequenced and mapped 5S rRNA genes along the transcribed 5S block of chromosome 5 contained in two overlapping YAC units, using sequence and restriction polymorphisms present in 5S rRNA genes (Cloix *et al.*, 2002). We also used the sequences provided by the Arabidopsis genome sequencing project (AGI, 2000). The 5S array on chromosome 5 is between positions 11 184 799 (euchromatic side) and 11 333 900 (centromere-proximal side), but its sequencing is incomplete. An increasing number of mutations along the 5S genes, and the presence of the most mutated 5S rDNA units at the centromere-proximal side of the block, were observed in both analyses (AGI, 2000; Cloix *et al.*, 2002). We counted the number of cytosines in symmetrical (CG and CXG) or asymmetrical (CXX, where X is not a G) contexts in more than 100 5S rDNA sequences, and established the ratio of C asymmetric:C symmetric sites for each 5S rDNA sequence (a 5S rDNA unit is composed of a 120-bp transcribed region and a 380-bp spacer sequence). Using a test of tendancy (W statistics, $P < 0.05$; Chessel, 1978), we could demonstrate a gradient for the C-asymmetric:C-symmetric ratio, starting from 1.6–1.75 at the euchromatin-proximal side (where most of the major 5S genes reside), and reaching 2.2 at the centromere-proximal side (where the most mutated 5S genes were found) (Figure 8).

Therefore, an increase of asymmetrical methylation will have a larger impact on 5S rDNA units at the centromere-proximal side, whereas a decrease of symmetrical methylation will affect the 5S rRNA genes more at the euchromatic

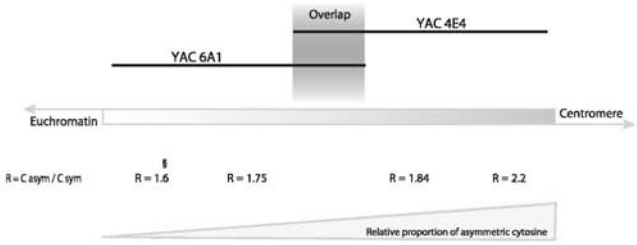


Figure 8. The relative proportion of asymmetrical cytosines increases towards the centromere along the 5S rDNA block of chromosome 5.
Previous mapping results of 5S rRNA genes along the 5S block of chromosome 5 (Cloix *et al.*, 2002) and sequences provided by the Arabidopsis genome sequencing project (AGI, 2000) were used.
The gray rectangle represents the tandemly-repeated 5S rDNA array. The gray gradient symbolizes the increasing number of mutations in the 5S rRNA genes of the array.
§Most of the major genes reside in this region of the 5S array. R, number of cytosines in an asymmetrical context:number of cytosines in a symmetrical context. The relative proportion of asymmetrical cytosines increases from the euchromatic-proximal side towards the centromeric side. (The situation is inverse for symmetrical cytosines.) To evaluate the ratio, the same 250-bp fragment, covering the 120-bp transcribed region and 130-bp from the spacer, and containing around 50 cytosines, was considered for each 5S rDNA unit. (More than 100 sequences were analyzed.)

© 2008 The Authors

side. These results might explain the incorporation into chromocenters of the centromere-proximal 5S rDNA units, with a relatively greater asymmetrical methylation, and the concomitant transcription of the euchromatin-proximal 5S rRNA genes, with a relatively larger symmetrical hypomethylation.

Discussion

We found the silencing of the expression of minor 5S rRNA genes to be reversed, despite an increased proportion of 5S rDNA within heterochromatic chromocenters, which occured in parallel with an increase of total heterochromatin. This was associated with hypermethylation at non-symmetrical (CATG) sites and hypomethylation at symmetrical (CG/CXG) sites. Hypomethylation results from GC-culture conditions, and leads to derepression of minor 5S rRNA genes. Despite a strong hypomethylation of 5S rDNA, however, no release of minor 5S rRNA genes was observed in the *met1-1* mutant.

Hypo- and hypermethylation may occur concomitantly in 5S rDNA

It has been proposed that the relaxation of epigenetic gene repression is associated with DNA hypomethylation, and is a common response to unfavorable conditions (Madlung and Comai, 2004). Culture in a growth chamber is not expected to be stressful, but seedlings grown for 3 weeks in such conditions probably lack lateral space and height, and both 5S rDNA and 180-bp centromeric repeats were hypomethylated at symmetrical sites. Interestingly, Luo and Preuss (2003) observed different methylation patterns at Arabidopsis centromeric sequences in seedlings derived from seeds produced in a greenhouse, or in a growth chamber. Environmental changes, such as mechanical stimulus and cold, also decreased DNA methylation in the plant *Bryonia dioica* (Galaud *et al.*, 1993) and in maize (Steward *et al.*, 2002), respectively. Arabidopsis displays DNA hypomethylation at (peri)centromeric repeats, such as the 180-bp unit, upon attack by *Pseudomonas syringae* (Pavet *et al.*, 2006). Efforts are needed, however, to investigate which demethylases(s), ROS1 (repressor of silencing 1) (Agius *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2005) or DEMETER (Choi *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2006), are involved in DNA hypomethylation triggered by environmental impacts.

If DNA hypomethylation results from the stressful GC-culture conditions, hypermethylation probably reflects the ageing of the plants. Hypermethylation occured at non-symmetrical (CXX) sites of 5S rDNA and of 180-bp repeats, but other sequences might have been heterochromatinized, and may account for the larger chromocenters observed in the 3-week-old GC-grown plants.

To avoid a supplementary parameter, we used plants outside the floral transition because, according to Tessadori *et al.* (2007), we observed a transient large-scale reduction of compact chromatin over the short period that corresponds specifically with the floral transition.

The ratio of methylation between symmetrical and asymmetrical contexts may define which proportion of 5S rDNA appears as euchromatin and which appears as heterochromatin

Wild-type GC-grown plants displayed an enlarged heterochromatic 5S rDNA fraction compared with GH-grown plants. The asymmetrical methylation (observed in all genotypes grown in GC) was apparently able to 'compensate' the symmetrical hypomethylation, and thus to increase the heterochromatic 5S rDNA fraction in the WT plants, but not in *met1* or *cmt3* nuclei, where the symmetrical hypomethylation was more pronounced.

Our previous analyses (Vaillant *et al.*, 2007) performed on leaves of 3-week-old plants grown in a greenhouse revealed a similar heterochromatic fraction of ~30% of the 5S rDNA in WT and DNA methyltransferases mutants, in spite of the strong 5S rDNA hypomethylation at symmetrical sites in these mutants. The presence of asymmetrical methylation in the GH-*met1-1* mutant plants was checked (Figure S2), and might explain this constant 5S rDNA heterochromatic fraction. The situation of *ddm1* is particular. We found a release of minor 5S genes silencing together with a decrease of the heterochromatic 5S rDNA fraction (Mathieu *et al.*, 2003). As the DDM1 protein is required for DNA methylation through its chromatin remodeling activity (Brzeski and Jerzmanowski, 2003; Jeddeloh *et al.*, 1999), the methylation balance, and consequently the proportion of heterochromatic 5S rDNA, is shifted in this mutant.

Based on these results, we hypothesize that the genotype- or environment-mediated ratio between the two methylation types (symmetrical and asymmetrical) regulates the 5S rDNA heterochromatin level.

5S rDNA hypomethylation is associated with the activation of silenced 5S rRNA sequences

A common response to unfavorable conditions is DNA hypomethylation associated with the activation of silenced sequences (Madlung and Comai, 2004). The presence of minor 5S rRNA seems to result from hypomethylation at 5S rDNA symmetrical sites in GC-L*er* and GC-*cmt3-7* plants. However, in *met1-1* plants with the lowest CG methylation level, which are consequently expected to harbor the largest silencing release, we did not recover minor 5S rRNAs. MOM1 is part of a silencing pathway that acts independently of DNA methylation (Amedeo *et al.*, 2000). We have previously reported that MOM1 participates in the control of

© 2008 The Authors

5S gene silencing, and may counteract the release of silencing (Vaillant *et al.*, 2006, 2007). This might contribute to limit the proportion of minor 5S rRNA in highly hypomethylated contexts, such as in the GC-*met1-1* plants where hypomethylation results from both the mutation and the GC-culture conditions. GC-*met1-1* mutant plants, like their GC counterparts, accumulated an increased total level of 5S rRNA, probably needed for their accelerated growth. Therefore, in any genotype or environmental context, the plant manages optimal 5S rRNA production in terms of both quantity and quality.

Presence of an increasing gradient of the C-asymmetric: C-symmetric ratio inside a 5S array

As mentioned in the Results, 5mC residues are subject to transition mutations, such as the spontaneous deamination of 5mC that leads to thymine. It results in CXX depletion, and the replacement of CG and CXG by cytosines in the asymmetrical context. Non-transcribed units were previously shown to have a higher A + T content (Mathieu *et al.*, 2002b). Compared wth transcribed (major) 5S rDNA units, they have lost CG and CXG sites but have a comparable number of asymmetrical cytosines. They therefore display a significantly higher C-asymmetric:C-symmetric ratio.

In a model proposed for the maintenance of the heterochromatic state of Arabidopsis pericentromeric sequences, such as 5S rDNA, the RISC (RNA-induced silencing complex) is guided by small interfering RNA (siRNA) (Onodera *et al.*, 2005). It is difficult to assume that 21–24-nt 5S siRNA can discriminate between major (transcribed) and minor (repressed) 5S rRNA genes (5S siRNAs corresponding to both genes have been found) in order to drive DNA methylation via RISC. The presence of an increasing gradient of the C-asymmetric:C-symmetric ratio along a 5S array might explain the different behaviour of 5S rDNA subpopulations inside the 5S array. In conditions where hypermethylation at CXX sites and concomitant DNA hypomethylation at CG and CXG sites is observed, genes containing the highest relative proportion of non-symmetrical cytosines will become hypermethylated, whereas genes with the highest relative proportion of symmetrical cytosines will become hypomethylated. The latter genes are present on the euchromatin-side of the 5S array.

In conclusion, in culture conditions that are obviously not optimal for the plants, the nuclei displayed larger total, as well as 5S rDNA, heterochromatic fractions. This was observed together with a release of the silencing of minor 5S rRNA genes. Interestingly, the *met1-1* mutation did not increase the response, and contrarily, no release of minor 5S rRNA genes was observed in this mutant despite a severely reduced DNA methylation. In light of our results, it seems there is a 'survey' of the 5S rDNA expression to ensure appropriate ribosome production in every genotype or environment condition. Interestingly, following reduced CG and CNG methylation at 5S rDNA, CXX methylation increased in successive *met1-3* (a null allele) generations, and allowed the plant to partially return to a WT 5S rDNA transcription (Mathieu *et al.*, 2007). Our results are in accordance with recent developments that suggest that environment can exert its effect via genomic and epigenetic responses.

Experimental procedures

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana met1-1 and *cmt3-7* plants in the L*er* background, as well as WT plants of accessions L*er* and Col were used. S. E. Jacobsen provided the seeds of the *met1-1* and *cmt3-7* mutants. For GH conditions, plants were grown in soil in a greenhouse during winter and spring under standard conditions, with an 18-h photoperiod provided by SON-T AGRO 400-watt lamps, at 22°C (± 4°C; the temperature was controlled using an aerotherm system). For GC conditions, seeds were surface sterilized and sown on agar plates containing MS solution or soil. The plates were incubated for 2 days at 4°C to break any residual dormancy of the seeds, and were then transferred into a growth chamber at 23°C with a 16-h photoperiod. The leaves from 3- or 5-week-old plants were used for the experiments.

Isolation of nucleic acids and gel blot analysis

Total genomic DNA was isolated from a pool of plants for each genotype according to the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Doyle, 1987). Genomic DNA (300 ng) was digested with 20 U of restriction enzyme in the recommended buffer (New England Biolabs, http://www.neb.com). Digested DNA was electrophoresed on 0.8% (w/v) agarose gels overnight, depurinated in 0.25 N HCl and capillary blotted onto Hybond-N^+ membranes (Amersham, http://www.amersham.com).

Total RNA was extracted as described in Mathieu *et al.* (2003), and for the RNA gel blot analysis 2 μg of total RNA per lane was transfered on 1% (w/v) agarose/1.9% (v/v) formaldehyde gels, and then capillary blotted onto Hybond-N^+ membranes (Amersham).

DNA probes were labeled with [α-^{32}P]deoxycytidine triphosphate (dCTP) using random hexamer priming (Megaprime DNA labeling system; Amersham). For quantifications, a phosphoimager (Molecular Imager FX; Bio-Rad, http://www.bio-rad.com) was used.

Reverse transcription PCR and sequencing

The reverse transcription reactions and 5S cDNA amplifications were performed as described in Mathieu *et al.* (2003).

Statistics

Minor 5S rRNA frequencies were compared using the Fisher's exact test for a 2 × 2 contingency table. The probabilities were calculated from a one-tailed test. Statistical analyses of 5S rRNA levels and cytosine methylation frequencies were performed using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test with mean values comparison. The 5S rDNA signals inside the chromocenters were compared with

© 2008 The Authors

the χ^2 test. The heterochromatic fractions were compared with the non-parametric Kolmogorov–Smirnov test. The presence of a gradient for the C-asymmetric:C-symmetric ratio was confirmed with a non-parametric test of tendency (Chessel, 1978).

Cytogenetics

Fluorescent *in situ* hybridization, generation of nuclear suspensions, 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, measurement of chromocenter fractions and microscopic analysis were performed as described in Mathieu *et al.* (2003).

Quantification of 5S FISH signals

Digital images of nuclei after DAPI staining and with 5S FISH signals were processed and merged using PHOTOSHOP software (Adobe Systems, http://www.adobe.com). Gray-scale images were then analyzed with the freeware program NIH-IMAGE 1.62.

Acknowledgements

We thank Steven Jacobsen for providing *met1-1* and *cmt3-7* seeds, I. Jouan for statistical analysis and H. Le for computer analysis of sequences. This work was supported by the CNRS, the Université Blaise Pascal, and a grant from the French Ministry of Research (ACI BCMS 04-5486), from the INCA (Institut National du Cancer, Reseau Epipro) and from the Auvergne region. IV and JD were supported by a graduate studentship from the French Ministry of Research.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Figure S1. Hypomethylation and hypermethylation at 180-bp centromeric repeats.

Figure S2. Asymmetrical 5S rDNA methylation in glasshouse-grown (GH)-*met1-1* plants.

This material is available as part of the online article from http://www.blackwell-synergy.com

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796–815.

Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 11796–11801.

Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (2000) Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature*, **405**, 203–206.

Bartee, L., Malagnac, F. and Bender, J. (2001) Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev.* **15**, 1753–1758.

Brzeski, J. and Jerzmanowski, A. (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J. Biol. Chem.* **278**, 823–828.

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.

Chan, S.W., Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 351–360.

Chessel, D. (1978) La description non paramétrique de la dispersion spatiale des individus d'une espèce. In *Biométrie et Ecologie* (Legay, J. M. and Tomassone, R., eds). Paris: Société Française de Biométrie, pp. 45–135.

Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell*, **110**, 33–42.

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.

Doyle (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull.* **19**, 11–15.

Finnegan, E.J. and Kovac, K.A. (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **43**, 189–201.

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1998) DNA methylation in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 223–247.

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. USA*, **99**, 14584–14589.

Fransz, P., ten Hoopen, R. and Tessadori, F. (2006) Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **14**, 71–82.

Galaud, J.P., Lareyre, J.J. and Boyer, N. (1993) Isolation, sequencing and analysis of the expression of Bryonia calmodulin after mechanical perturbation. *Plant Mol. Biol.* **23**, 839–846.

Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, **124**, 495–506.

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, **111**, 803–814.

Grant-Downton, R.T. and Dickinson, H.G. (2006) Epigenetics and its implications for plant biology 2. The 'epigenetic epiphany': epigenetics, evolution and beyond. *Ann. Bot.* **97**, 11–27.

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.

Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**(Suppl.), 245–254.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. and Richards, E.J. (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* **22**, 94–97.

Kapoor, A., Agius, F. and Zhu, J.K. (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* **579**, 5889–5898.

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E. (2001) Requirement of

© 2008 The Authors

CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077–2080.

Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. and Martienssen, R. (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol.* **1**, E67.

Luo, S. and Preuss, D. (2003) Strand-biased DNA methylation associated with centromeric regions in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 11133–11138.

Madlung, A. and Comai, L. (2004) The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann. Bot.* **94**, 481–495.

Martienssen, R.A. and Colot, V. (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, **293**, 1070–1074.

Mathieu, O., Picard, G. and Tourmente, S. (2002a) Methylation of a euchromatin-heterochromatin transition region in *Arabidopsis thaliana* chromosome 5 left arm. *Chromosome Res.* **10**, 455–466.

Mathieu, O., Yukawa, Y., Sugiura, M., Picard, G. and Tourmente, S. (2002b) 5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J.* **29**, 313–323.

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

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.

Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 24–35.

Mittelsten Scheid, O., Probst, A.V., Afsar, K. and Paszkowski, J. (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 13659–13662.

Murata, M., Heslop-Harrison, J.S. and Motoyoshi, F. (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.

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.

Palmgren, G., Mattsson, O. and Okkels, F.T. (1991) Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* **95**, 174–178.

Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L. and Alvarez, M.E. (2006) Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 577–587.

Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. and Fischer, R.L. (2007) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 6752–6757.

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

Richards, E.J. (1997) DNA methylation and plant development. *Trends Genet.* **13**, 319–323.

Ruiz-Garcia, L., Cervera, M.T. and Martinez-Zapater, J.M. (2005) DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. *Planta*, **222**, 301–306.

Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F. (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J.* **21**, 6549–6559.

Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. (2002) Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J. Biol. Chem.* **277**, 37741–37746.

Tariq, M. and Paszkowski, J. (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet.* **20**, 244–251.

Tessadori, F., van Driel, R. and Fransz, P. (2004) Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends Plant Sci.* **9**, 147–153.

Tessadori, F., Schulkes, R.K., van Driel, R. and Fransz, P. (2007) Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.* **50**, 848–857.

Tompa, R., McCallum, C.M., Delrow, J., Henikoff, J.G., van Steensel, B. and Henikoff, S. (2002) Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr. Biol.* **12**, 65–68.

Tran, R.K., Zilberman, D., de Bustos, C. *et al.* (2005) Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in Arabidopsis. *Genome Biol.* **6**, R90.

Tutois, S.C.C., Mathieu, O., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2002) Analysis of 5S rDNA Loci among Arabidopsis ecotypes and subspecies. *Genome Lett.* **1**, 115–122.

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.

Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A. *et al.* (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell*, **126**, 1189–1201.

Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, V.V., Agius, F. and Zhu, J.K. (2007) The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **17**, 54–59.

Zilberman, D. and Henikoff, S. (2004) Silencing of transposons in plant genomes: kick them when they're down. *Genome Biol.* **5**, 249.

© 2008 The Authors

Article n°5 :

« Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of Nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in *Arabidopsis*»

Frederic Pontvianne, Isabel Matía, **Julien Douet**, Sylvette Tourmente, Francisco J. Medina, Manuel Echeverria and Julio Sáez-Vásquez

***Molecular Biology of the Cell*,** 2007, 18, 369-379.

Molecular Biology of the Cell
Vol. 18, 369–379, February 2007

Characterization of *AtNUC-L1* Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of *AtNUC-L2* Gene in *Arabidopsis*[D]

Frederic Pontvianne,* Isabel Matía,† Julien Douet,‡ Sylvette Tourmente,‡ Francisco J. Medina,† Manuel Echeverria,* and Julio Sáez-Vásquez*

*Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 5096, Université de Perpignan, Perpignan, 66860 Perpignan, France; †Centro de Investigaciones Biológicas-Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Ramiro de Maetzu 9, E-28040 Madrid, Spain; and ‡Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6547, BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France

Submitted August 25, 2006; Revised October 27, 2006; Accepted November 2, 2006
Monitoring Editor: Wendy Bickmore

Nucleolin is one of the most abundant protein in the nucleolus and is a multifunctional protein involved in different steps of ribosome biogenesis. In contrast to animals and yeast, the genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* encodes two nucleolin-like proteins, AtNUC-L1 and AtNUC-L2. However, only the *AtNUC-L1* gene is ubiquitously expressed in normal growth conditions. Disruption of this *AtNUC-L1* gene leads to severe plant growth and development defects. AtNUC-L1 is localized in the nucleolus, mainly in the dense fibrillar component. Absence of this protein in *Atnuc-L1* plants induces nucleolar disorganization, nucleolus organizer region decondensation, and affects the accumulation levels of pre-rRNA precursors. Remarkably, in *Atnuc-L1* plants the *AtNUC-L2* gene is activated, suggesting that *AtNUC-L2* might rescue, at least partially, the loss of AtNUC-L1. This work is the first description of a higher eukaryotic organism with a disrupted nucleolin-like gene and defines a new role for nucleolin in nucleolus structure and rDNA chromatin organization.

INTRODUCTION

Biogenesis of ribosomes takes place in the most prominent subnuclear structure: the nucleolus. Here, the tandem rRNA genes encoding the 18S, 5.8S, and 25S structural rRNAs are transcribed by RNA polymerase I as a precursor or pre-rRNA, which is then processed into mature forms that assemble with ribosomal proteins to form ribosome particles (for review, see Lam *et al.*, 2005). The driving force for the assembly of the nucleolus is transcription of the tandem rRNA gene repeats, as has been shown conclusively by the assembly of nucleoli at active rRNA genes integrated at ectopic locations (Oakes *et al.*, 1998, and references therein). The synthesis of rRNA is completely inhibited during mitosis, when nucleoli disassemble and the rDNA is arranged in a partially condensed form at the nucleolus organizer regions (NOR). When rRNA synthesis resumes at the end of mitosis, nucleoli reassemble (Hernandez-Verdun, 2005).

In interphase cells, the nucleolus is formed by three basic components: the fibrillar center (FC), the dense fibrillar component (DFC), and the granular component (GC). Occasionally, depending on cell type and stage, other structures such as vacuoles can also be observed in plant nucleolus (Gonzalez-Melendi *et al.*, 2001). It has been accepted for some time that ribosome biosynthesis occurs in a vectorial pattern within the nucleolus. The transcription of pre-rRNA probably occurs at the border of the FC and DFC; the early processing steps of pre-rRNA occur in the DFC; and the later processing and RNA modification steps, together with the formation of preribosomal particles is observed in the GC (Thiry and Lafontaine, 2005; Raska *et al.*, 2006).

Several nonribosomal nucleolar proteins as well as many small nucleolar ribonucleolar protein complexes (snoRNPs) have been implicated in the different steps of rRNA production and ribosome assembly (Fromont-Racine *et al.*, 2003). Nucleolin is one of the most abundant nonribosomal proteins in the nucleolus, where it plays a key role in the different steps involved in ribosome biogenesis, including RNA polymerase (Pol) I transcription and processing of pre-rRNA (Ginisty *et al.*, 1998; Roger *et al.*, 2003), assembly and nucleocytoplasmic transport of ribosome particles (Bouvet *et al.*, 1998). Nucleolin and nucleolin-like proteins have been described in a large variety of organisms, including Chinese hamster, mouse, rat, human, chicken, frog, yeast, and plants (for review, see Ginisty *et al.*, 1999). In these protein sequences, three structural and multifunctional domains have been identified: the acidic N-terminal region, the central region that contains two or four RNA RRM domains, and the C-terminal region or GAR domain (Ginisty *et al.*, 1999).

Mutations of genes encoding nucleolin homologue in budding (*NSR1*) and fission (*GAR2*) yeast produce severe effects on cell growth and disrupt balanced production of the small and large ribosomal subunits (Lee *et al.*, 1992; Gulli *et al.*, 1995). Moreover, it has been shown that the nucleolar

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06–08–0751) on November 15, 2006.

[D] The online version of this article contains supplemental material at *MBC Online* (http://www.molbiolcell.org).

Address correspondence to: Julio Sáez-Vásquez (saez@univ-perp.fr).

© 2007 by The American Society for Cell Biology

structure in *gar2* cells is dramatically reorganized and unusual structures are detected (Leger-Silvestre *et al.*, 1997). However, mutations that abolish nucleolin gene expression have not yet been reported in a higher organism. Thus, most of our knowledge on the function of this protein in higher eukaryotic cells comes from in vitro studies using acellular systems, microinjection experiments, or overexpression of a nucleolin transgene in *Xenopus* oocytes (Yanagida *et al.*, 2001; Roger *et al.*, 2002, 2003). Only two reports have described the effect of reduction of nucleolin in higher organisms. These reports revealed that reduction of the nucleolin by RNA interference (RNAi) in human cells increases expression of p53 protein (Takagi *et al.*, 2005) and inhibits RNA polymerase I transcription (Angelov *et al.*, 2006).

To obtain information about the role of nucleolin in vivo in higher eukaryotes, we have characterized an *Arabidopsis thaliana* mutant plant with a disrupted nucleolin-like gene. In contrast to animals and yeast, the *A. thaliana* genome encodes two nucleolin-like proteins, AtNUC-L1 and AtNUC-L2, but only the former is ubiquitously expressed and seems to play the role of its animal counterpart. We show that disruption of the *AtNUC-L1* gene affects plant growth and development and demonstrate that *AtNUC-L1* gene expression is required to preserve the ultrastructure of the nucleolus and NOR condensation. Remarkably, in *Atnuc-L1* plants, the *AtNUC-L2* gene is expressed and rescues, at least partially, *AtNUC-L1* disruption. The role and biological significance of these two genes are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth Conditions and Mutant Isolation

All lines were derived from *A. thaliana* Columbia (Col 0) ecotype. Seeds were first sowed on Murashige and Skoog medium (MS) or on soil and left 2 d at 4°C to synchronize. Plants were then grown either under continuous light (MS plants) or under a 16:8-h light/dark cycle (soil plants). Seeds corresponding to *Atnuc-L1* (SALK_053590 and SALK_502764) plants lines were obtained from the Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (http://nasc.life.nott.ac.uk). Seeds of T-DNA insertion line SALK_053590 that have been backcrossed to Col 0 were used for further analysis.

AtNUC-L1 and AtNUC-L2 Cloning

Cloning of cDNA sequences encoding *AtNUC-L1* (At1g48920) and *AtNUC-L2* (At3g18610) was performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with total RNA isolated from 15-d-old *A. thaliana* wild-type (WT) and *Atnuc-L1* plants, respectively. Primers *5'nuc1* and *3'nuc1* to amplify *AtNUC-L1* and *5'nuc2 and 3'nuc2* to amplify *AtNUC-L2* are located at the beginning of the ATG start and TGA stop codons (Figure 1A).

Methods Related to RNA

Total RNA was extracted from 15-d-old *A. thaliana* plants by using TRIzol reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). After treatment with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI) to eliminate contaminant DNA, first-strand cDNA synthesis was performed on 5 μg of total RNA by using the ProSTAR first-strand RT-PCR kit following the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, CA). To ensure that the amount of the amplified products remains in linear proportion, a semiquantitative RT-PCR reaction of 25 cycles was performed using a PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA).

Primer extension analysis was performed using total RNA and specific 5'-end labeled primers as previously described (Saez-Vasquez *et al.*, 2004). Primers used were *tis* for detection of primary pre-rRNA precursor (+104 nucleotides from transcription initiation site [TIS]) and *p* (+1362 nucleotides from TIS) for detection of pre-rRNA cleaved at the P site (Figure 9A). Dideoxy sequencing reactions were performed using the *fmol* DNA Cycle Sequencing System (Promega) with a pGem-3Z plasmid vector containing the *A. thaliana* rDNA sequences from −520 to +1940 (Gruendler *et al.*, 1989).

-β Glucuronidase (GUS), -Green Fluorescent Protein (GFP), and Histology Studies

The 1.1-kilobase pair (kbp) sequence of the *AtNUC-L1* gene promoter was amplified from genomic DNA by using primers *p5'nuc1* and *p3'nuc1* and fused to a GUS reported gene in the vector pCAMBIA1381 (CAMBIA, Canberra, Australia). *A. thaliana* plants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 by using the "floral-dip" method (Clough and Bent, 1998). GUS activity staining was performed according to Sessions *et al.* (1999).

Gateway cassettes with AtNUC-L1 and -L2 coding sequences were generated by polymerase chain reaction (PCR) following instructions by Invitrogen (Carlsbad, CA). Resulting PCR product was introduced first into pDNR221 (Invitrogen) and then cloned by recombination into pK7FWG2 to produce AtNUC-L1(L2)::GFP plasmid. For transient expression, 5 μg of plasmid was coated to 1.6-μm gold particles (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the Bio-Rad transformation. The onion epidermal layers were transfected using the PDS-1000/He biolistic transformation system (Bio-Rad), and fluorescence was observed 24 h later.

For cytological analysis, plant tissues were fixed overnight at 4°C with 2.5% formaldehyde (37% stock solution), 2.5% glutaraldehyde (25% stock solution), 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2, rinsed twice in the same buffer, and then dehydrated through a graded ethanol series before being embedded in Technovit 7100 resin (Kulzer, Wehrheim, Germany). Sections of 4 μm were obtained with a RM 2255 microtome (Leica, Heerbruss, Switzerland) and stained for 15 s with 1% toluidine blue solution containing 1% of sodium tetraborate.

All microscopic images—GUS, GFP, and toluidine blue staining—were observed using a Zeiss Axioskop 2 microscope and recorded using a Leica DC 300 FX digital camera (Leica).

Electron Microscopy, Immunofluorescence, and Immunogold Techniques

Immunofluorescence was performed using 4- and 8-d-old (WT and *Atnuc-L1*, respectively) *A. thaliana* seedlings following the procedures for immunocytological and structural analysis described previously (Gonzalez-Camacho and Medina, 2005). Treated seedlings were incubated with α-NUC1 diluted 1:1000 or with α-NUC2 diluted 1:250 for 16 h at 37°C and then with fluorochrome A-488–conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:100, for 3 h at 37°C. Finally, the samples were mounted in anti-fading mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution. Preparations were visualized with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope and recorded with a Photometrics digital camera (CE 200A; Leica).

For electron microscopy experiments, 4- and 8-d-old *A. thaliana* roots were fixed with either 3% glutaraldehyde (ultrastructural studies) or with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde (immunogold experiments). To obtain a higher resolution of the ultrastructure of nucleolus, fixed *A. thaliana* roots were additionally acetylated and methylated with a 5:1 methanol/acetic acid solution as described previously (Testillano *et al.*, 1995). Then, the tissues were dehydrated and embedded in LR White resin (London Resin, Bershire, United Kingdom). For immunogold, ultrathin sections were mounted on Formvar-coated nickel grids and incubated with α-NUC1 diluted 1:100 for 1 h 30 min, at room temperature (RT). After several washes to remove excess of primary antibodies, grids were incubated with goat-anti rabbit IgG coupled with 10-nm colloidal gold particles (Sigma-Aldrich) diluted 1:50 for 1 h, at RT. In all electron microscopical experiments grids were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Jeol 1200 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

In both immunofluorescence and immunogold experiments, negative controls, consisting of the omission of the first antibody were performed.

Western Blotting

Plant material (0.2 g) was homogenized and extracted in 2 ml of 50 mM Tris-Cl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% NP-40, 0.5% sodium desoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM β-mercaptoethanol, and 20 μl of anti-protease cocktail (Sigma-Aldrich). The extracts were cleared by centrifugation at 13,000 × *g* for 15 min and conserved at −80°C. SDS-PAGE, and Western blot was performed as described previously (Saez-Vasquez *et al.*, 2004). The membranes were hybridized with a 1:10,000 dilution of α-NUC1 or with a 1:5000 dilution of α-NUC2. Rabbit polyclonal antibodies against C-terminal peptide sequence of AtNUC-L2 (Figure 1C) were customer made by NeoMPS (Strasbourg, France).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

ChIP was performed as described in Gendrel *et al.* (2005). To amplify rDNA promoter sequences, we used primers *5'prom* (−110 nucleotides from TIS) and *3'ets* (+219 nucleotides from TIS) (Figure 9). The T24H24.15 gene, used as control, encodes a phosphofrutokinase β-subunit, and the primers used for gene amplification are described in Gendrel *et al.* (2005).

FISH experiments were performed according to Schubert *et al.* (2001). The probe containing intergenic spacer and 5'-external transcribed sapcer (ETS) rDNA sequences cloned in pGem-T was amplified by PCR by using universal primers T7/M13R and by supplying biotin-16-dUTP (Roche, Meylan, France) to the reaction. The biotin-labeled probe was detected using avidin-conjugated with Texas Red (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100; Vector Laboratories) and avidin-Texas Red (1:500). Slides were mounted using Vectashield (Vector

Laboratories) mounting medium with 1.5 μg/ml DAPI and then observed by fluorescence microscopy, by using an AxioPlan2 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). Images were acquired using the Axiocam MRm camera (Carl Zeiss) and the software Axiovision 4.2 (Carl Zeiss). Images were further processed and enhanced using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Sequencing Analysis and Primers

All clones used in this study were sequenced with a model 3100DNA sequencer and an ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Database searches were performed at the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) and the *Arabidopsis* Information Resources (http://www.arabidopsis.org). Primers used in this work are described in Supplemental Table S1.

Primers

All primers used in this study were customer made by Eurogentec (Seraing, Belgium). Primers were as follows: 5′*nuc1*, 5′-ATGGGAAAGTCTAAATCCCGCACC-3′; 3′*nuc1*, 5′-CTACTCGTCACCGAAGGTAGTC-3′; 5′*nuc2*, 5′-ATGGGCAAGTCTAGTAAGAAATCC-3′; 3′*nul2*, 5′-CTACTCTTCATCATTAAAGACCGTC-3′; 5′*act2*, 5′-GTTAGCAACTGGGATGATA-3′; 3′*act2*, 5′-CAGCACCAATCGTGATGACTTGCCC-3′; *tis*, 5′-CCTCGTGCCGATATCCGATACCATCCC-3′; *p*, 5′-CATCAATCGTTCCAACTAATCTAC-3′; *prom*, 5′-CCAAGCTTGTATCCTTATGATGCATGC-3′; 5′*ets*, 5′-GAGAACTGCTGAGAAAACTCGG-3′; p5′*nuc1*, 5′-CATAACCAAGTCAATCCTTG-3′; and p3′*nuc1*, 5′-CCATGGGGAGAACTGAGAAAGAGACGAC-3.

RESULTS

The A. thaliana Genome Contains Two Nucleolin-like Protein Genes

We initiated the molecular and functional characterization of two genes encoding nucleolin-like proteins in *A. thaliana*, namely, *AtNUC-L1* and *AtNUC-L2*. These two genes are located in duplicated regions of chromosome 1 and chromosome 3, respectively (http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup). However, *AtNUC-L1* and *AtNUC-L2* genes show divergent genomic organization (Figure 1A). From the starting ATG to the TGA stop codon, the *AtNUC-L1* gene is 3480 nucleotides and contains 15 exons, whereas the *AtNUC-L2* gene is 3553 nucleotides long and contains 18 exons. Interestingly, *AtNUC-L2* contains four tandemly repeated sequences, consisting of the second part of exon 4 and the following intron (Supplemental Figures 1A and S1A). These sequences are also found in the nucleolin-like sequence described in pea (Tong *et al.*, 1997).

The predicted AtNUC-L1 and AtNUC-L2 proteins are 557 and 636 amino acids, respectively, and share 49% identity (Figure 1C). Both have a tripartite structure as described for nucleolin in animals and Gar2p/Nsr1p proteins in yeast (Figure 1B). However, in contrast to nucleolin in vertebrates, which have four RRM domains, the *A. thaliana* sequences contain two RRM domains as in NSR1p/GAR2p proteins.

AtNUC-L1 contains seven stretches of aspartic acid (D), glutamic acid (E), and serine (S) residues, compared with 10 in AtNUC-L2 (Figure 1, B and C). Coding sequences for at least two of these additional acidic stretches in AtNUC-L2 are located within exons in the first and fourth tandemly repeated sequences described above. Moreover, it is noteworthy that the potential AtNUC-L2-GAR domain is much less conserved than AtNUC-L1-GAR domain compared with the nucleolin -GAR domain from other species (Figure 1C). The putative GAR domain of AtNUC-L1 is 75% rich in glycine and arginine residues compared with a 47% in the AtNUC-L2 sequence. In animals, GAR domains are ~88% rich in glycine and arginine, suggesting a functional conservation of the GAR domain only in AtNUC-L1. Furthermore, the N-terminal region of AtNUC-L1 contains two potential bipartite nuclear localization signals (NLSs), whereas there is only one NLS in AtNUC-L2 (Figure 1C).

Additional plant nucleolin-like proteins were identified by Blast searches by using as query the entire AtNUC-L1 and AtNUC-L2 protein sequences. Phylogenetic analysis showed that nucleolin-like sequences from *A. thaliana*, rice, onion, maize, tobacco, alfalfa, and pea form a plant-specific group (Supplemental Figure S2). This shows that plant genes diverged from a common ancestor very early during plant evolution and also reveals that the two genes in rice and *A. thaliana* result from separate and recent duplication events. This is also supported by results indicating that nucleolin homologues of alfalfa are encoded by a small multigene family (Bogre *et al.*, 1996). Unfortunately only one sequence is available.

In conclusion, *A. thaliana AtNUC-L1* and *AtNUC-L2* genes encode similar but distinct nucleolin-like proteins, homologous to NSR1p and GAR2p proteins in fungi.

The AtNUC-L1 Gene Is Constitutively Expressed but Not AtNUC-L2

To test expression of *AtNUC-L1* and *AtNUC-L2*, we performed a semiquantitative RT-PCR analysis. As shown in Figure 2A, primers *5′nuc1* and *3′nuc1* amplify a band of ~1750 kbp in roots (R), rosette leaf (RL), cauline leaf (CL), stem (ST), flowers (F), siliques (Si), and seeds (S) (top, lanes 1–7). We confirmed by sequencing that this band corresponds to specific *AtNUC-L1* transcripts and not to genomic sequences, which produce an ~3.5 kbp band containing intron sequences (data not shown). In contrast, PCR amplification using primers *5′nuc2* and *3′nuc2* did not detect *AtNUC-L2* cDNA transcripts in any of these samples (Figure 2A, middle, lanes 1–7). PCR reactions using specific primers to amplify *ACTIN2* transcripts were used to verify amounts of cDNA in each reaction (Figure 2A, bottom, lanes 1–7).

To test *AtNUC-L1* and *AtNUC-L2* promoter activity, we transformed *A. thaliana* plants with a plasmid construct containing the GUS reporter gene fused to either the *AtNUC-L1* or *AtNUC-L2* promoter sequence (Figure 2B). We observed that in plants transformed with the *AtNUC-L1::GUS* construct, staining was detected in all tissues and organs tested, including seedlings grown in vitro (S), RL, apical roots (AR), secondary roots (SR) and F. In contrast, in plants transformed with the *AtNUC-L2::GUS* construct, we did not detect GUS staining in any part of the plant (data not shown).

Next, to determine the presence of the AtNUC-L1 protein, we performed a Western blot analysis using protein extracts prepared from different plant tissues. As shown in Figure 2C, antibodies against AtNUC-L1, α-NUC1 (Saez-Vasquez *et al.*, 2004), cross-reacted with three distinct polypeptides, ~82, ~67, and ~46 kDa, in *A. thaliana* protein extracts. Both the ~82- and the ~67-kDa polypeptides were detected in leaves (lane 2), whereas the ~46-kDa polypeptide was detected only in roots (lane 1). These three polypeptides also were detected in seedling (Figure 4), flower, stem, and green siliques (data no shown). Nevertheless, none of the observed polypeptides correspond to the 59-kDa expected size of AtNUC-L1. We could show that the smaller 67- and 46-kDa bands derive from proteolysis of the 87-kDa protein (Supplemental Figure S4). This is similar to nucleolin, which in animals has aberrant migration on SDS-PAGE and is highly susceptible to proteolysis (Bouche *et al.*, 1984).

In conclusion, these results demonstrate that under normal growth and development conditions, only the *AtNUC-L1* gene is expressed and the *AtNUC-L2* gene promoter is not active.

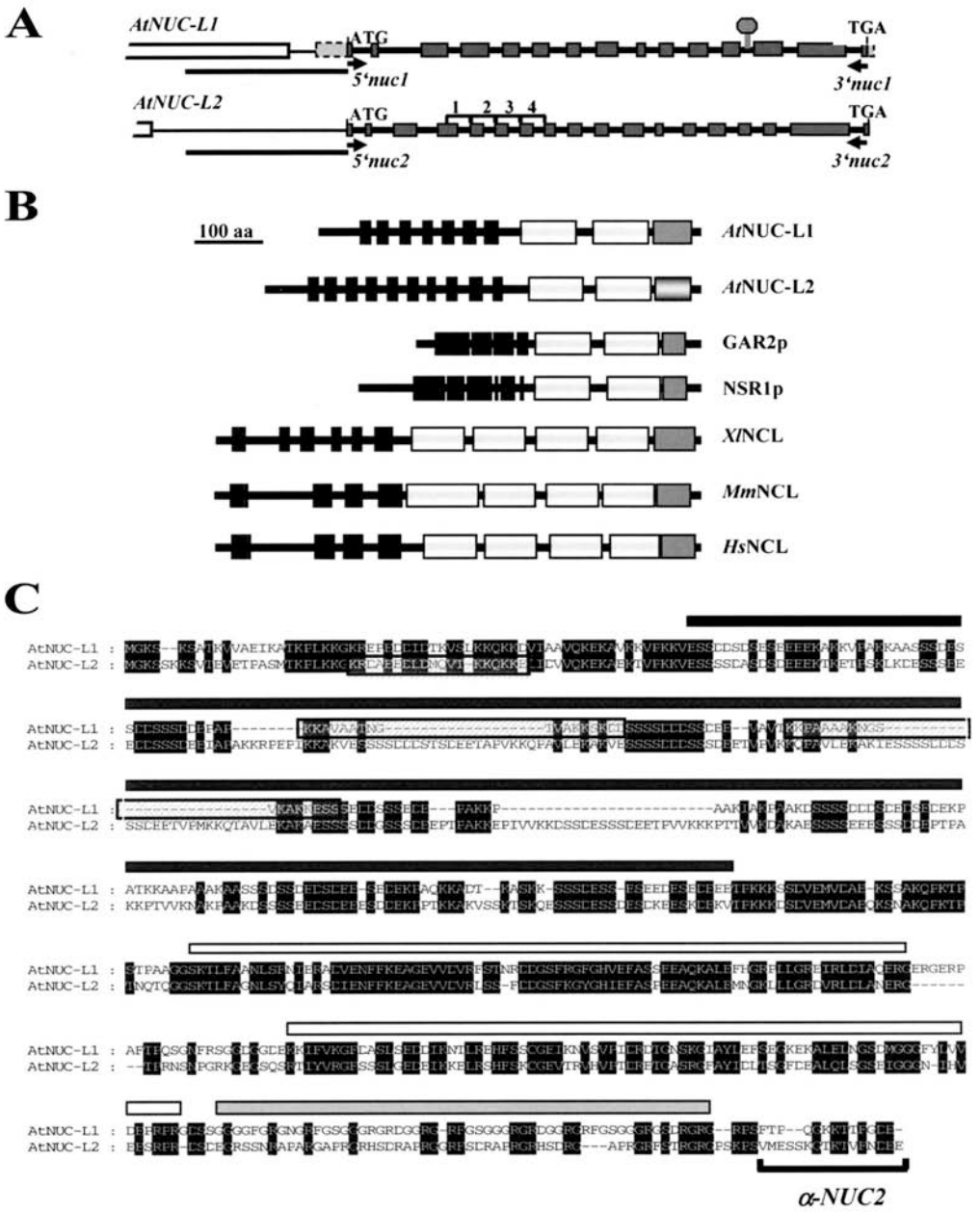


Figure 1. The *A. thaliana* genome encodes two nucleolin-like proteins. (A) Diagram of *AtNUC-L1 and L2* genes from the ATG start to the TGA stop codons. Gray boxes correspond to exons separated by fourteen introns. The T-DNA insertion in the *Atnuc-L1* plants is indicated by a gray diamond. Position of primers *5'nuc1* and *3'nuc1* used to detect *AtNUC-L1* transcripts are indicated by black arrows. White boxes shows At1g48930 and At3g18600 genes, localized upstream of *AtNUC-L1* and *AtNUC-L2*, respectively. Black bars under each gene show the 1.1- and 1.0-kbp DNA sequence fused to GUS reporter genes construct. Brackets 1–4 show tandemly repeated sequences in the *AtNUC-L2* gene.

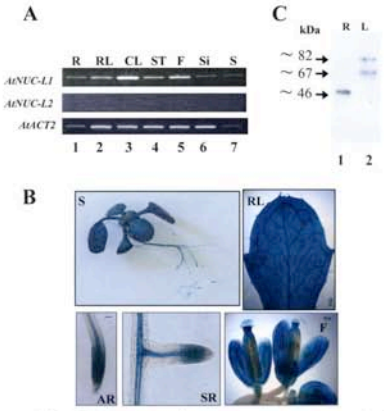


Figure 2. *AtNUC-L1* gene and protein expression in *A. thaliana* plants. (A) RT-PCR analysis of *AtNUC-L1* (top) and *AtNUC-L2* (middle) gene expression in roots (R), rosettes leaves (RL), cauline leaves (CL), stem (ST), flowers (F), siliques (Si), and seeds (S). *AtACT2* (bottom) gene expression was analyzed as a PCR control to evaluate the amount of cDNA used in each reaction. (B) Analysis of the AtNUC-L1 promoter activity in *A. thaliana* plants transformed with a *AtNUC-L1:GUS* construct. The GUS staining is visualized in 3-wk-old S, RL, apical root (AR), secondary root (SR), and F. (C) Western blot analyses of AtNUC-L1 protein expression in R (lane 1) and leaves using α-NUC-L1 antibodies.

AtNUC-L1 Localizes Preferentially in the DFC of the Nucleolus

To test whether AtNUC-L1 localizes in the nucleolus of *A. thaliana* plants, we used an immunofluorescence and immunogold labeling approach. After incubation of *A. thaliana* root meristematic cells with α-NUC1, the immunofluorescence labeling seemed specifically concentrated in the nucleolus (Figure 3, left, and Supplemental Figure S5). DAPI staining was visualized around the nucleolus because the concentration of intranucleolar chromatin, which is mostly in a decondensed state, makes it undetectable with the light microscope (Figure 3, middle). The merged confocal image clearly shows the nucleolar specificity of the AtNUC-L1 localization (Figure 3, right). However, AtNUC-L1 did not seem to be evenly distributed in the nucleolus. This feature was more evident in those nucleoli showing a lower labeling intensity (Figure 3A, arrows). We did not see nucleoplasmic or cytoplasmic labeling.

Figure 1 (cont). (B) Schematic representation of nucleolin and nucleolin-like proteins from *A. thaliana* (AtNUC-L1 and L2), *Schizosaccharomyces pombe* (GAR2p), *Saccharomyces cerevisiae* (NSR1p), *X. laevis* (*Xl*NCL), *Mus musculus* (*Mm*NCL), and *Homo sapiens* (*Hs*NCL). The black boxes correspond to the acidic regions in the N-terminal domain, the white boxes represent the RRM domains, and the dark gray boxes represent the GAR domain. The light gray box in the AtNUC-L2 sequence indicates the less conserved GAR domain. (C) Amino acid sequence alignment of AtNUC-L1 and AtNUC-L2 proteins. Conserved amino acids are black shaded. The black rectangle shows the acidic N-terminal domain, the white rectangles show the two RRM domains, and the gray rectangle the putative GAR domain. The putative nuclear localization signals of AtNUC-L1 and AtNUC-L2 are boxed. Specific antibodies α-NUC2, were prepared against the peptide sequence located in the C-terminal domain.

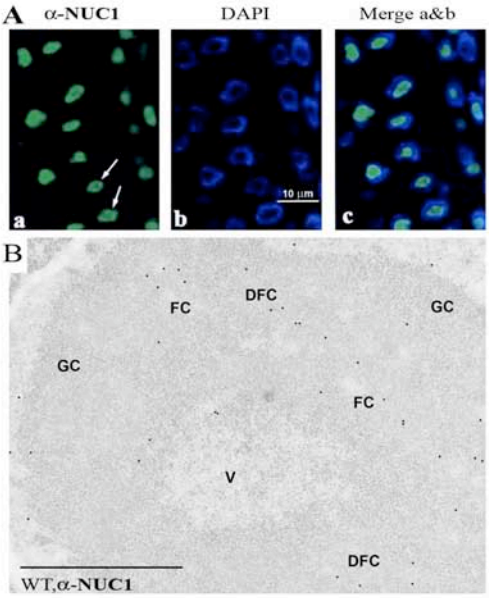


Figure 3. Nucleolar localization of AtNUC-L1. (A) Immunofluorescence localization of AtNUC-L1 in *A. thaliana* root meristematic cells fixed with paraformaldehyde/dimethyl sulfoxide and incubated with α-NUC1 antibodies, observed with the confocal microscope. The images correspond to a single optical section, obtained with a Z-step of 0.3 µm. Labeling is shown concentrated in the nucleolus (a), but it does not seem evenly distributed through the whole nucleolar area (arrows). Nucleoplasm labeled by DAPI is observed as a ring around the dark unstained nucleolus (b), and the merged image shows that the immunofluorecent labeling localizes precisely in the nucleolus, unstained by DAPI (panel c). (B) Immunogold electron microscopic localization of AtNUC-L1 in *A. thaliana* root meristematic cells. AtNUC-L1 is observed to localize in the DFC, relatively near FCs. The interior of FCs seems devoid of gold particles, whereas the GC and the nucleolar vacuole (V) show a very scarce labeling, the same as nucleoplasm. Bar, 1 µm.

To establish precisely the intranucleolar distribution of AtNUC-L1 protein, we used immunogold electron microscopical detection (Figure 3B). We observed that in the nucleolus, the AtNUC-L1 labeling was preferentially concentrated in the DFC surrounding fibrillar centers (FCs). No gold particles were observed within FCs, and very little labeling was detected in the granular component (GC) and in the nucleolar vacuole (V). Some AtNUC-L1 labeling was also detected in the nonnucleolar region of the nucleus. However, gold particles were detected neither in the cytoplasm nor in the organelles, demonstrating that AtNUC-L1 localizes exclusively in the nucleus and nucleolus of *A. thaliana* cells.

Disruption of AtNUC-L1 by a T-DNA Insertion Induces AtNUC-L2 Expression

To investigate the functional role of AtNUC-L1 in vivo, an *Atnuc-L1* homozygous line was isolated. In these mutant line (SALK_053590), expression of the *AtNUC-L1* gene was disrupted by a T-DNA insertion shown in Figure 1A.

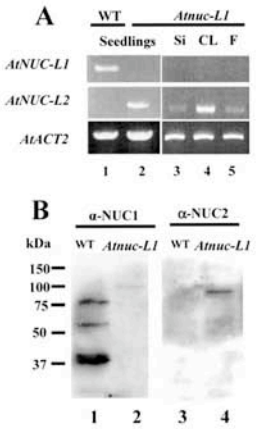


Figure 4. Disruption of *AtNUC-L1* induces expression of *AtNUC-L2*. (A) RT-PCR reaction using cDNA prepared from RNA isolated from 15-d-old seedlings (lanes 1 and 2), siliques (Si; lane 3), cauline leaves (CL; lane 4), and flowers (F; lane 5) (B). Whole cell protein extract from WT and *Atnuc-L1* plants were fractionated on SDS-PAGE and hybridized either with α-NUC1 (lanes 1 and 2) or with α-NUC2 antibodies (lanes 3 and 4).

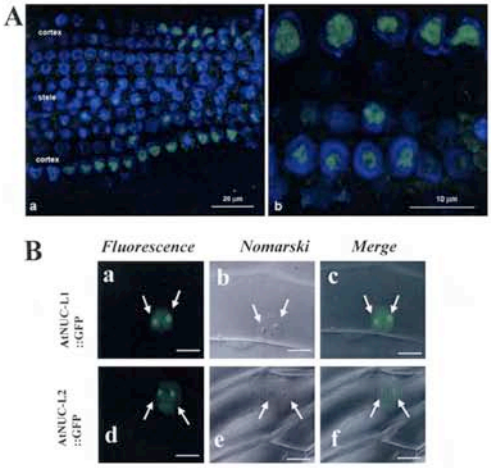


Figure 5. AtNUC-L2 is a nucleolar protein. (A) Immunofluorescent localization of AtNUC-L2 in *Atnuc-L1* plants. The images represent single optical sections, obtained using a Z-step of 0.3 μm. In a, a panoramic overview of the root is displayed, showing the differential distribution of the labeling in the different parts of the root, the cortex showing a more intense labeling, and the stele a fainter immunostaining. In b, a higher magnification is shown, with nucleoli being the major target of the antibody. (B) Nucleolar localization of AtNUC-L1::GFP and AtNUC-L2::GFP fusion protein in transfected onion epidermis cells. Arrows point the two nucleolus visualized by the GFP fluorescence (a and d). Nucleolus can be easily observed by Nomarski (b and e), and they colocalize with the GFP in the merge images (c and f).

RT-PCR analysis using primers *5′nuc1* and *3′nucl* does not detect *AtNUC-L1* transcripts in *Atnuc-L1* seedlings or in the different plant tissues tested (Figure 4A, top, lanes 2–5). Remarkably, RT-PCR reactions using primers *5′nuc2* and *3′nuc2* amplified a band of ~1.9 kbp in *Atnuc-L1* but not in the WT plants (Figure 4A, middle, lanes 1 and 2). Cloning and sequencing confirmed that this band is the product of amplification of specific *AtNUC-L2* transcripts and not from genomic sequence, which produces an ~3.6-kbp band containing intron sequences (data not shown). The *AtNUC-L2* transcripts are detectable in all tissues and plant organs tested, including siliques, leaves, and flowers (lanes 3–5), revealing constitutive expression of *AtNUC-L2* gene in this plant. RT-PCR reactions using specific primers to *ACTIN2* transcripts were used to verify amounts of cDNA in each reaction (Figure 4A, bottom, lanes 1–5). Analysis of another mutant line (SALK_502764) displayed also *AtNUC-L2* transcription induction (data not shown).

To determine the presence of the AtNUC-L2 protein, we performed Western blot analysis using antibodies against AtNUC-L1 (Figure 4B). This antibody was raised against the central domain of AtNUC-L1, which is 61% identical to AtNUC-L2 domain, and we expected a cross-reaction. Indeed, α-NUC1 detected an ~100-kDa polypeptide in *Atnuc-L1* protein extracts (lane 2) that it is not present in the WT protein extract (lane 1). This result was confirmed using a specific antibody raised against C-terminal peptide of AtNUC-L2. This antibody is specific to AtNUC-L2 and does not recognize AtNUC-L1 (Figure 4B, lane 3). These antibodies also detected the ~100-kDa polypeptide only in the *Atnuc-L1* plants (Figure 4B, lane 4) but not in the WT plants (lane 3), confirming that this polypeptide corresponds to AtNUC-L2 protein. The expected molecular mass of AtNUC-L2 is 69 kDa, which does not match the size of the detected ~100-kDa polypeptide. As we mentioned, this can be explained by the atypical migration of nucleolin and nucleolin-like proteins in SDS-PAGE. It is also interesting to observe that α-NUC2 did not detect smaller polypeptides as did α-NUC1 in WT plants (Figure 4B, lane 1).

AtNUC-L2 Is a Nucleolar Protein and Localizes in the Nucleolus of Atnuc-L1 Plants

To obtain some insight on the role of AtNUC-L2 in the *Atnuc-L1* plants, we established its cellular localization in *Atnuc-L1* plants by immunofluorescence. Using α-NUC2 antibodies, we observed a nucleolar signal in root meristematic cells of *AtNUC-L1* plants (Figure 5A). However, a larger view of the root meristem revealed different signal intensities in the cellular layer with a more intense signal in the peripheral cortex and a weaker signal in the central stele (Figure 5A, a). These two lateral regions of the meristem are characterized by a differential proliferative activity, which is higher in the cortex (Scheres, 2001).

To confirm the nucleolar localization of AtNUC-L2 in WT cells, we transformed epidermal onion cells by bombardment using an AtNUC-L2::GFP plasmid. As shown in Figure 5B, in transiently transformed onion cells the AtNUC-L2::GFP fusion protein was found in the nucleus, in a diffuse pattern through the nucleoplasm, but it was concentrated in the nucleolus, visualized by two intense GFP fluorescent signals (Figure 5B, d). The nucleus and nucleolus of onion cells are easily visualized by Nomarski (Figure 5B, e), and the GFP fluorescence colocalizes with these structures (Figure 5B, f). Similar results were observed in onion cells transformed with an AtNUC-L1::GFP plasmid used as a control (Figure 5B, a–c).

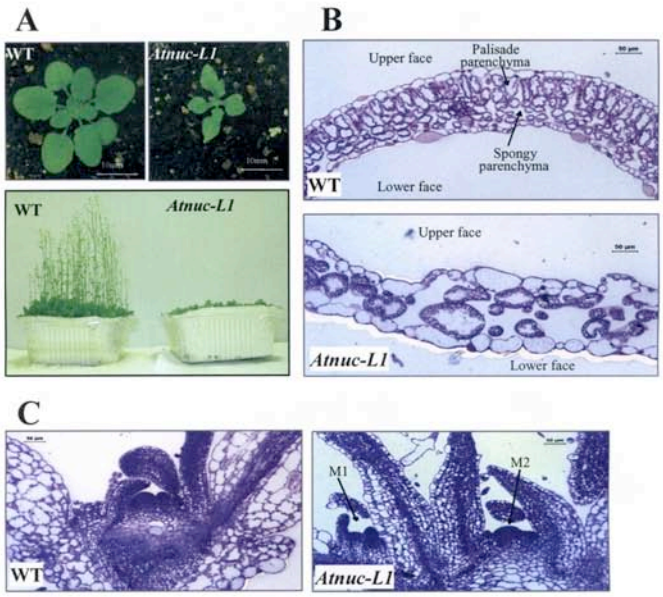


Figure 6. *AtNUC-L1* gene disruption affects growth and plant development. (A) *A. thaliana* WT and *Atnuc-L1* plants grown on soil 4 (top) or 6 (bottom) wk under a 16:8 (L:D)-h cycle. (B and C) Transverse section of first leaves (B) and apical meristem (C) from WT and *Atnuc-L1* plants stained with toluidine blue. Arrows M1 and M2 show two meristems in *Atnuc-L1* plants. Bars, 50 μm.

AtNUC-L1 Disruption Affects Plant Growth and Development

Atnuc-L1 plants grew slower than WT plants and the newly emerged leaves were smaller, pointed, irregular shaped, and scrunched (Figure 6). However, when these plants were grown further, the pointed shape of later leaves was less severe, but they remained smaller than WT leaves (Figure 6A). We observed also major phenotypic changes in flower, sepals, anthers and siliques (data not shown). It is also interesting to mention that *Atnuc-L1* plants produced a reduced number of seeds. Analysis of the second mutant line (SALK_502764) displayed similar growing and developmental phenotypes (data not shown).

To further analyze the *Atnuc-L1* phenotype, we performed cytological analysis of primary leaves and young seedlings grown on MS media (Figure 6, B and C). Transversal sections of the first leaf revealed that whereas control leaves have the typical leaf structure of WT dicotyledonous plants, the *Atnuc-L1* leaves exhibited significant reduction in the number of cells. We further observed changes in size and form of cells that create considerable disorganization in every cell layer (Figure 6B). Moreover, it was amazing to observe that at the same developmental stage as WT plants (4 d old), most of the *Atnuc-L1* plants (7 d old) displayed two apical meristems (Figure 6C), but only one meristem was fully developed during plant growth.

AtNUC-L1 Gene Disruption Causes Nucleolus Disorganization of Atnuc-L1 Plants

Given the nucleolar localization of AtNUC-L1, we examined the nucleolar structure of the *Atnuc-L1* cells. As shown in Figure 7, a distinct morphological change was observed in the mutant *Atnuc-L1* compared with the wild-type cells. In the *Atnuc-L1* plants, the nucleolus was completely disorga-

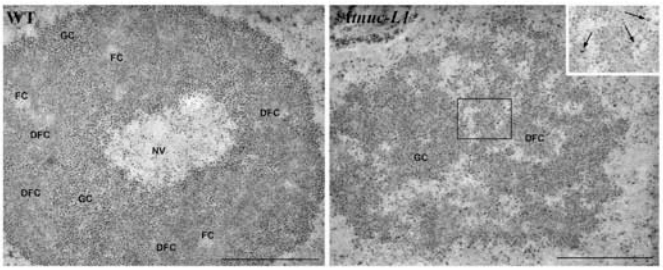


Figure 7. *AtNUC-L1* gene disruption affects ultrastructure of the nucleolus. The WT nucleolus is formed by some masses of DFC, which contain FCs in their interior and that are surrounded by GC. These components seem organized forming a cortex surrounding a central nucleolar "vacuole" (NV) in which granules similar to those of the GC can be identified. In *Atnuc-L1* plants, this nucleolar organization is lost. Small masses of DFC can hardly be identified, and the bulk of the nucleolus is composed by a component reminiscent of the GC, but with the granules more loosely packed and embedded in a matrix. Numerous interstices occur, in some cases connected with the nucleoplasm. In the border between the GC-like component and the interstices, some granules can be observed. They are larger than the usual nucleolar GC granules and seem either isolated or forming small loose clusters (see in the inset a magnification of the area contained in the square). They have been identified as NPGs (arrows in the inset). Bar, 1 μm.

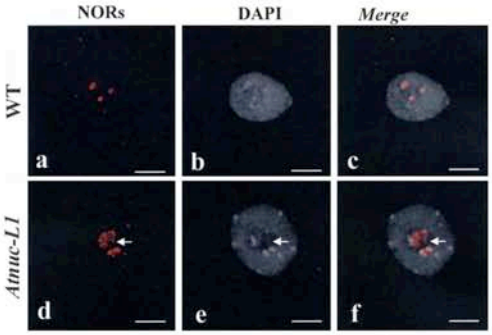


Figure 8. NOR condensation is affected in *Atnuc-L1* plants. FISH in nuclei of WT (a–c) and *Atnuc-L1* (d–f) seedlings. Left, FISH using rRNA gene probe shown in Figure 9A (a and d); middle, chromatin counterstained with DAPI (b and e); and right, superposition of a and b (c) and d and e (f) images. Arrows shows FISH signals that do not colocalize with heterochromatin. Bar, 5 μm.

nized. The nucleolus was often seen as an open "reticulate" nucleolar structure with many interstices that seem to communicate with the nucleoplasm. Subnucleolar structures show profound changes, such as the disappearance of FCs, strong reduction of the DFC as a distinct component, and the alteration of the GC which, in the mutant nucleolus, seems formed by loosely packed granules embedded in a matrix (compare WT and *Atnuc-L1* images in Figure 7). Furthermore, a second type of granules, other than those of the GC, can be identified in the mutant nucleolus. They show a larger size and occur either as single entities or loosely packed in clusters of a few of them. They are often found at the nucleolar interstices, peripherally located with respect to the masses of granular (or fibrillo-granular) component. We have identified these granules as the so-called "nucleolar perichromatin-like granules" (NPGs), which were previously described in the nucleolus of cells treated with some inhibitors of RNA metabolism (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1983; Risueno and Medina, 1986). Occasionally, nucleoli of *Atnuc-L1* cells lost their spherical shape and become more elongated (data not shown). Moreover, the characteristic nucleolar vacuole observed in G_2 and sometimes in G_1 of WT cells disappeared in the *Atnuc-L1* cells.

In conclusion, these observations clearly show that AtNUC-L1 is required for nucleolus structure in *A. thaliana*.

AtNUC-L1 Gene Disruption Induces rDNA Heterochromatin Decondensation

To determine the effect of the absence of AtNUC-L1 on the state of rDNA chromatin structure, WT and *Atnuc-L1*–derived NORs were examined in interphase nuclei by using a FISH probe containing intergenic spacer and 5′-ETS rDNA sequences (Figure 9). In *A. thaliana* cells, four rDNA loci located at the tips of chromosomes 2 and 4 are found in diploid nucleus. As shown in Figure 8, we detected two to four NOR fluorescence signals in WT interphase nuclei, in agreement with Pontes *et al.* (2003), due to association of homologous NORs. FISH analysis of the WT nuclei revealed a high condensation of NOR sequences and shows a tight colocalization with heterochromatin structure counterstained with DAPI (Figure 8, a–c). In the *Atnuc-L1* background (Figure 8, d–f), we observed an increase in the number of NOR signals (52% of the nuclei analyzed displayed more than four NOR signals; see Supplemental Table S1), rDNA sequences seem to be decondensed in all nuclei when compared with WT. Moreover, in the *Atnuc-L1* context, we observed that some FISH signals no longer colocalize with heterochromatin structure (arrows, panel d, e and f). This indicates that condensed NORs in WT plants acquire some euchromatic features in the *Atnuc-L1* context. Finally, we could not see a significant difference in the number and size of centromeres between the DAPI labeled nuclei in WT and *Atnuc-L1* plants, indicating that decondensation observed in *Atnuc-L1* plants has occurred in the NORs.

In conclusion, these results show that AtNUC-L1 helps to maintain rDNA chromatin structure.

AtNUC-L1 Gene Disruption Affects rRNA Synthesis

We have previously reported that in cruciferous plants, a nucleolin-like protein is a component of a large U3snoRNP complex that binds 5′-ETS rDNA sequence (Caparros-Ruiz *et al.*, 1997) and accurately cleaves pre-rRNA at the primary processing site (P site) in vitro (Saez-Vasquez *et al.*, 2004).

To demonstrate that AtNUC-L1 binds rDNA in vivo, chromatin from WT and *Atnuc-L1* plants was extracted and immunoprecipitated with antibodies against AtNUC-L1. A PCR reaction using primers *prom* and 5′*ets* (shown in Figure 9A) detected rDNA only in ChIP fractions obtained from chromatin extracted from WT plants (Figure 9B, lane 3). We did not detect rDNA amplification in ChIP fractions obtained from *Atnuc-L1* plants chromatin (Figure 9B, lane 5), indicating that α-NUC1 specifically immunoprecipitated AtNUC-L1–bound rDNA chromatin. No or faint bands were detected in the PCR reactions by using either chromatin incubated with protein A alone (Figure 9B, lanes 2 and 4) or with unrelated antibodies (Figure 9B, lane 6). We did not detect any band when the PCR reaction was performed using the same ChIP fraction and primers specific to the T24H24.15 gene used to demonstrate specific interaction of AtNUC-L1 with the rDNA (Figure 9B, lanes 2–6). Thus, this result shows that AtNUC-L1 specifically binds rDNA chromatin in WT plants and suggests that this interaction may be required for rDNA chromatin organization.

To investigate whether synthesis of pre-rRNA was affected in the *Atnuc-L1* plants, we measure the accumulation of primary pre-rRNA precursor produced by RNA Pol I and processed pre-rRNA at the primary cleavage site (P site). Primer *tis* maps the transcription initiation site accurately, TIS (Figure 9C, lanes 5–7; Saez-Vasquez and Pikaard, 1997) and allows quantification of pre-rRNA precursors, whereas primer *p* accurately maps the primary cleavage site, P (Figure 9C, lanes 11–13; Saez-Vasquez *et al.*, 2004) and allows quantification of processed pre-rRNA precursors. To compare the ratio between primary pre-rRNA and cleaved pre-rRNA (TIS/P) in WT and *Atnuc-L1* plants, *tis* and *p* primers were added simultaneously to the same primer extension reactions (Figure 9C, lanes 8–10). In these conditions, we observed that the TIS/P ratio was 1:4 in WT plants (Figure 9C, lane 8) and 1:24 in *Atnuc-L1* plants (Figure 9C, lane 9), signifying an increase of approximately sixfold of pre-rRNA cleaved at the P site in the *Atnuc-L1* plants. Moreover, in the *Atnuc-L1* plants, primer extension experiments using primer *tis* also gave a detectable signal at +11 and +29 nucleotides downstream from the normal start site (+1) (Figure 9C, lane 6). Note that even if we detect a stronger TIS signal in the WT than in *Atnuc-L1* plants (Figure 9C, compare lanes 5 and 6), the +11 and +29 signals are not detectable at all in the control plants. Similarly, the *p* primer also produced at least two additional distinct signals in *Atnuc-L1* plants, upstream

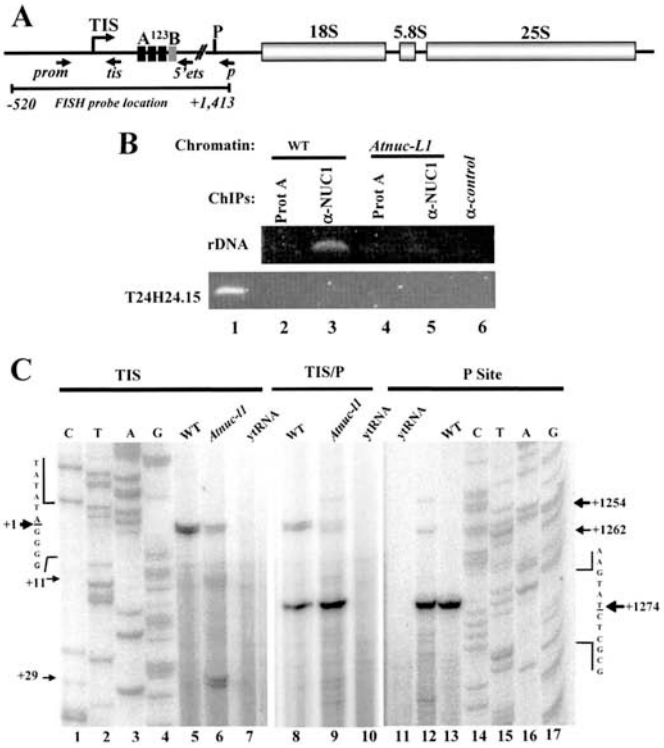


Figure 9. AtNUC-L1 binds rDNA and affects rate of processing of pre-rRNA. (A) Diagram of an *A. thaliana* rDNA unit containing the 18S, 5.8S, and 25S rRNA genes. TIS at +1 and primary cleavage site (P) at +1275 are indicated. The $A^{123}B$ box (from +131 to +183), indicates the rDNA binding site of the U3snoRNP complex containing nucleolin-like protein in plants cruciferous. Blacks arrows show position of primers *prom* and *5'ets* used for ChIPs experiments; and primers *tis* and *p* used to measure RNA Pol I transcription and pre-rRNA processing respectively. (B) Chromatin isolated from WT and *Atmuc-L1* plants was incubated either with protein A only (lanes 2 and 4) or with α-NUC1-conjugated to protein A (lanes 3 and 5) or with unrelated antibodies (lane 6). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR to detect rDNA (top) or T24H24.15 control (bottom) genes. Lane 1 corresponds to PCR amplification using chromatin isolated from WT plants to verify amplification of T24H24.15 gene. (C) Primer extension experiments were performed using total RNA extracted from WT and *Atmuc-L1* plants and primer *tis* (lanes 5 and 6) or *p* (lanes 12 and 13) or *tis* and *p* together (lanes 8 and 9). Lanes 7 and 10 and 11 correspond to control reactions using yeast tRNA. Lanes 1–4 and 14–17 show DNA sequencing reactions used to accurately map transcription initiation site and pre-RNA processing at the P site, respectively.

from the P site: at +1254 and at +1262 (Figure 9C, lane 12). Interestingly, the amount of 18S, 5.8S, and 25S rRNA final products does not seem to be affected in the *Atmuc-L1* plants (data not shown).

Together, these observations demonstrate that AtNUC-L1 disruption affects processing (and maybe also transcription) of pre-rRNA not only at the P site but also at other putative and/or abnormal processing sites.

DISCUSSION

The results described here provide new data to understand the in vivo role of nucleolin-like proteins not only in plants but also in higher eukaryotes. We report that in contrast to mammals and yeast, the *A. thaliana* genome encodes two nucleolin like proteins, AtNUC-L1 and AtNUC-L2, which are probably derived from a recent genome duplication event (Supplemental Figures 1 and S2). The data presented here also reveal that under normal growth conditions, only the *AtNUC-L1* gene is expressed, suggesting that AtNUC-L1 protein is the functional homologue of nucleolin and NSR1/GAR2 proteins (Figures 2 and 3).

Additionally, we show that disruption of the *AtNUC-L1* gene provokes changes in growth and plant development (Figure 6). Interestingly, the retarded growth, pointed leaf, and cellular disorganization phenotype observed in the *Atmuc-L1* plants is reminiscent of phenotypes reported in two mutated ribosomal protein gene loci, RPS13 (Ito *et al.*, 2000) and RPS18 (Van Lijsebettens *et al.*, 1994), suggesting a functional relationship between AtNUC-L1 and some early steps of ribosome assembly. Indeed, we have identified RPS13 and RPS18 associated with a large U3snoRNP complex containing nucleolin-like protein (our unpublished data), which is involved in early processing of pre-rRNA in *B. oleracea* (Saez-Vasquez *et al.*, 2004). Moreover, it has been also shown that these two RP proteins bind 18S rRNA and are 40S early ribosome assembly proteins in yeast (Xiang and Lee, 1989). Nevertheless, despite all these observations, it is likely that the phenotype observed in *Atmuc-L1* can also be due to an effect on one or several of the multifunctional roles described for nucleolin in eukaryotes (Ginisty *et al.*, 1999; Srivastava and Pollard, 1999).

AtNUC-L1 is localized in the nucleolus in the DFC surrounding FC at the site of rRNA transcription (which occurs in the border zone between FC and DFC; Gonzalez-Melendi *et al.*, 2001, and references therein); we also demonstrate that AtNUC-L1 disruption has a major effect on nucleolus structure. We have observed that the nucleolus is completely disorganized in the *Atmuc-L1* plant, reminiscent of the ultrastructural changes observed in the yeast nucleolus of *gar2* (Leger-Silvestre *et al.*, 1997). Among other changes, the typical "large vacuole", well known in the nucleolus of plants (Shaw and Jordan, 1995), disappears in the *Atmuc-L1* plants. Interestingly, AtNUC-L1 does not localize in the nucleolar vacuole (Figure 3), and the absence of this structure could be

due to early ribosome assembly steps requiring AtNUC-L1 as mentioned above.

Decondensation of NOR in *Atnuc-L1* plants is remarkable. Chromatin is generally considered as a prerequisite for transcriptional activation, in such a way that the amount of decondensed chromatin is taken as a marker of the gene expression activity, either real or potential. The decondensation of rDNA has no discernible effect on rRNA mature transcripts level, as observed in the *HDA6* mutant (Earley *et al.*, 2006). One explanation would be that increased rRNA gene transcription is undetectable. Alternatively, the number of active rRNA genes may change in *Atnuc-L1* mutant without changing the overall level of transcription. In *S. cerevisiae*, the number of active rRNA genes can change more than twofold without changing steady-state rRNA transcript levels owing to compensatory changes in the average number of RNA polymerases engaged in transcription of each gene (French *et al.*, 2003).

The increased NOR chromatin decondensation in *Atnuc-L1* plant nucleoli could be also considered contradictory with the reduced amount of pre-rRNA precursors observed in Figure 9. A possible interpretation may be the uncoupling of mechanisms controlling transcription and early processing of pre-rRNA (Gallagher *et al.*, 2004; Saez-Vasquez *et al.*, 2004). Indeed, the data presented in Figure 9 provide evidence that *AtNUC-L1* gene disruption induces changes in the ratio of primary pre-rRNA and processed pre-rRNA at the P site. We cannot establish if the lesser amount of pre-rRNA is due to inhibition of RNA pol I transcription or a higher rate of pre-rRNA processing at the P site. However, it is probably that both transcription and processing of pre-rRNA are affected in *Atnuc-L1*. Indeed, in vitro assays and microinjection experiments in *X. laevis* oocytes showed a role of nucleolin in both transcription of pre-rRNA (Roger *et al.*, 2002) and in the first step of pre-rRNA processing (Ginisty *et al.*, 1998). Moreover, our results also show that AtNUC-L1 binds the rDNA promoter in vivo; consequently, we expect that the absence of AtNUC-L1 in mutant plants might also affect rDNA condensation and gene transcription. These observations are supported by a recent study demonstrating that *Xenopus laevis* nucleolin modifies chromatin structure and facilitates RNA Pol II transcription (Angelov *et al.*, 2006).

Our results show that AtNUC-L1 is not only involved in the primary cleavage site of pre-rRNA, but probably also in other processing events in vivo (Figure 9). It is possible that the absence of AtNUC-L1 in *Atnuc-L1* plants has an effect on correct folding of nascent pre-rRNA required for the different pre-rRNA processing events (Allain *et al.*, 2000). In this respect, the observation of the so-called NPGs in the modified nucleolar structure of mutant plant cells could be a sign of an altered pre-rRNA processing (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1983; Risueno and Medina, 1986).

A remarkable result of this work is the transcriptional activation of *AtNUC-L2* gene in *Atnuc-L1* plants. This activation suggests that AtNUC-L2 protein might rescue the *AtNUC-L1* gene disruption (Figures 4 and 5). We discarded the possibility of partial complementation by a truncated AtNUC-L1 protein, because we detected neither shorter *AtNUC-L1* transcripts encoding the acidic domain and the first RRM of AtNUC-L1 (based on the T-DNA insertion position) nor smaller polypeptides. Our data demonstrate that AtNUC-L2 localizes in the nucleolus and associates with large protein complexes, as does AtNUC-L1 (Supplemental Figures 5A and S3). Moreover, we demonstrate that the nucleolar localization of AtNUC-L2 is not the result of the nucleolar disorganization in *Atnuc-L1* plants. Indeed, AtNUC-L2 also localized in the nucleoli of onion cells, suggesting a nucleolar role for AtNUC-L2 in WT plants (Figure 5B). Finally, the possibility that AtNUC-L2 might replace AtNUC-L1 is supported by unsuccessful attempts to obtain *Atnuc-L1* and *Atnuc-L2* double mutation, which is probably lethal. However, despite all these observations, the activation of AtNUC-L2 is nonnatural in *Atnuc-L1* plants and raises the major question about the biological role of this second nucleolin-like gene in *A. thaliana*. Transcriptome analysis revealed that 333 genes (of ~25,000 gst; http://www.catma.org/) are deregulated in the *Atnuc-L1* plants, i.e., their expression is enhanced or repressed by more than 1.66 times (Hilson *et al.*, 2004). The *AtNUC-L2* gene is ranked 124th among 148 up-regulated genes. We know that the *Atnuc-L1* mutant lines are stressed plants; indeed, transcriptome analysis revealed that several stress related genes are also activated in the *Atnuc-L1* plants (data not shown). Therefore, it is tempting to propose that in *Atnuc-L1* the *AtNUC-L2* gene becomes activated to accomplish its role in a stressed plant, but in the absence of the AtNUC-L1, the induced AtNUC-L2 protein is recruited to the set of AtNUC-L1 associated factors to accomplish at least some of the AtNUC-L1 roles. These functions are probably achieved partially as a consequence of the structural differences between AtNUC-L1 and AtNUC-L2, in particular the less conserved GAR domain and the extended acidic N-terminal domain. So far, the analysis of an *A. thaliana* plant mutant line with a disrupted *AtNUC-L2* gene has not revealed any particular phenotype when it is grown in the same conditions as control plants.

How AtNUC-L1 controls *AtNUC-L2* expression? Transcriptional and or posttranscriptional mechanisms may be involved. This is one of the questions we are trying to answer. Thus far, although the role of AtNUC-L2 remains speculative and requires additional experimentation to establish its role in plant cells; our data indicate that conserved AtNUC-L1 plays an important role in chromatin regulation of rDNA genes, nucleolus structure, and growth in plants and possibly in other higher eukaryotes. Studies to establish more precisely the mechanisms involved in these major structural changes are the next challenge.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Delseny for supporting this work and our fellow laboratory member for stimulating discussion. We also thank R. Cooke for comments and corrections of English and J. R. Pages for computer assistance in artwork. We thank also J. P. Renou for help with the microarrays experiments. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique; by a grant to J.S.-V. and F.J.M. from PAI "Programme d'Actions Integrées franco-espagnol," Picasso 11398VF (French team) and HF 2005-0209 (Spanish team); by a grant from the French Ministry of Research (ACI BCMS 04-5486); and by the Spanish "Plan Nacional de I+D+I" (ESP2003-09475-C02-02). The CATMA program 2005 allowed transcriptome analysis of *Atnuc-L1*. F.P. is supported by a fellowship from Ministèrede l'Enseignement et de la Recherche.

REFERENCES

Allain, F. H., Bouvet, P., Dieckmann, T., and Feigon, J. (2000). Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. EMBO J. *19*, 6870–6881.

Angelov, D., *et al.* (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. EMBO J. *25*, 1669–1679.

Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D. T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E., and Hirt, H. (1996). Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMs1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. Plant Cell *8*, 417–428.

Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., and Amalric, F. (1984). Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. Nucleic Acids Res. *12*, 3025–3035.

Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., and Amalric, F. (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. J. Biol. Chem. *273*, 19025–19029.

Caparros-Ruiz, D., Lahmy, S., Piersanti, S., and Echeverria, M. (1997). Two ribosomal DNA-binding factors interact with a cluster of motifs on the 5′ external transcribed spacer, upstream from the primary pre-rRNA processing site in a higher plant. Eur. J. Biochem. *247*, 981–989.

Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. *16*, 735–743.

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.

French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. Mol. Cell Biol. *23*, 1558–1568.

Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. Gene *313*, 17–42.

Gallagher, J. E., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. Genes Dev. *18*, 2506–2517.

Gendrel, A. V., Lippman, Z., Martienssen, R., and Colot, V. (2005). Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. Nat. Methods *2*, 213–218.

Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. EMBO J. *17*, 1476–1486.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. J. Cell Sci. *112*, 761–772.

Gonzalez-Camacho, F., and Medina, F. J. (2005). The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. Histochem. Cell Biol. *125*, 139–153.

Gonzalez-Melendi, P., Wells, B., Beven, A. F., and Shaw, P. J. (2001). Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. Plant J. *27*, 223–233.

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.

Gulli, M. P., Girard, J. P., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., and Caizergues-Ferrer, M. (1995). gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation. Nucleic Acids Res. *23*, 1912–1918.

Hernandez-Verdun, D. (2005). Nucleolus in the spotlight. Cell Cycle *4*, 106–108.

Hilson, P., *et al.* (2004). Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. Genome Res. *14*, 2176–2189.

Ito, T., Kim, G. T., and Shinozaki, K. (2000). Disruption of an *Arabidopsis* cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. Plant J. *22*, 257–264.

Lam, Y. W., Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A. I. (2005). The nucleolus. J. Cell Sci. *118*, 1335–1337.

Lee, W. C., Zabetakis, D., and Melese, T. (1992). NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. Mol. Cell Biol. *12*, 3865–3871.

Leger-Silvestre, I., Gulli, M. P., Noaillac-Depeyre, J., Faubladier, M., Sicard, H., Caizergues-Ferrer, M., and Gas, N. (1997). Ultrastructural changes in the *Schizosaccharomyces pombe* nucleolus following the disruption of the gar2+ gene, which encodes a nucleolar protein structurally related to nucleolin. Chromosoma *105*, 542–552.

Oakes, M., Aris, J. P., Brockenbrough, J. S., Wai, H., Vu, L., and Nomura, M. (1998). Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. *143*, 23–34.

Pontes, O., Lawrence, R. J., Neves, N., Silva, M., Lee, J. H., Chen, Z. J., Viegas, W., and Pikaard, C. S. (2003). Natural variation in nucleolar dominance reveals the relationship between nucleolus organizer chromatin topology and rRNA gene transcription in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 11418–11423.

Puvion-Dutilleul, F., Nicoloso, M., and Bachellerie, J. P. (1983). Altered structure of ribosomal RNA transcription units in hamster cells after DRB treatment. Exp. Cell Res. *146*, 43–52.

Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. Curr. Opin. Cell Biol. *18*, 325–334.

Risueno, M. C., and Medina, F. J. (1986). The nucleolar structure in plant cells. Revis. Biol. Celular *7*, 1–154.

Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. (2002). Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. J. Biol. Chem. *277*, 10209–10219.

Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. (2003). Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. Chromosoma *111*, 399–407.

Saez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverria, M. (2004). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. Mol. Cell Biol. *24*, 7284–7297.

Saez-Vasquez, J., and Pikaard, C. S. (1997). Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 11869–11874.

Scheres, B. (2001). Plant cell identity. The role of position and lineage. Plant Physiol. *125*, 112–114.

Schubert, I., Fransz, P. F., Fuchs, J., and de Jong, J. H. (2001). Chromosome painting in plants. Methods Cell Sci. *23*, 57–69.

Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M. F. (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. Plant J. *20*, 259–263.

Shaw, P. J., and Jordan, E. G. (1995). The nucleolus. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *11*, 93–121.

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.

Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., and Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. Cell *123*, 49–63.

Testillano, P. S., Gonzalez-Melendi, P., Ahmadian, P., and Risueno, M. C. (1995). The methylation-acetylation method: an ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies. J. Struct. Biol. *114*, 123–139.

Thiry, M., and Lafontaine, D. L. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. Trends Cell Biol. *15*, 194–199.

Tong, C. G., Reichler, S., Blumenthal, S., Balk, J., Hsieh, H. L., and Roux, S. J. (1997). Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. Plant Physiol. *114*, 643–652.

Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., and Van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis* PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. EMBO J. *13*, 3378–3388.

Xiang, R. H., and Lee, J. C. (1989). Identification of proteins crosslinked to RNA in 40S ribosomal subunits of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie *71*, 1201–1204.

Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. (2001). Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. Proteomics *1*, 1390–1404.

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S sont regroupés en blocs situés dans l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 3, 4 et 5. La transcription des gènes d'ARNr 5S est régulée par des facteurs épigénétiques altérant notamment leur structure chromatinienne. Une étude a été menée durant les premières étapes du développement post-germinatif pour identifier les évènements et des facteurs conduisant à l'élaboration de telles structures. Nous avons pu observer une décompaction de l'ADNr 5S immédiatement suivie d'une recondensation. Ces phénomènes impliquent respectivement ROS1 et l'ARN polymérase IV. L'étude des formes Pol IVa et Pol IVb nous indique que Pol IVb, en plus de son activité partenaire de Pol IVa, possède une action spécifique dédiée au locus d'ADNr 5S du chromosome 4. Cette nouvelle activité de Pol IVb, qui est indispensable au silencing et à la compaction de ce locus, semble indépendante de la voie classique de méthylation de l'ADN dépendante des ARN.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, 5S rRNA genes are found clustered at pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5. 5S rRNA genes transcription is epigenetically regulated through the formation of specific chromatin structure. In order to determine the events that lead to the establishment of such structures, a study during the first steps of post-germinative plant development was done. Unexpectedly, we observed a decondensation followed by a rapid "re"condensation of 5S rDNA chromatin. These two phenomenons are respectively dependent on ROS1 and RNA polymerase IV activities. A more precise analyse on the two Pol IV isoforms, i.e. Pol IVa and Pol IVb, revealed a new function for Pol IVb. Indeed, in addition to its activity in a partnership with Pol IVa, Pol IVb has a specific role in the silencing and the compaction of the 5S rDNA locus from the chromosome 4. This activity seems to be independent of the Pol IVa activity and the RNA dependent DNA methylation pathway.

Mots-Clés

Arabidopsis thaliana, ADN ribosomique 5S, ARN Polymérase IV, ROS1, épigénétique, chromatine.