



**HAL**  
open science

# Etudes fonctionnelles des protéines nucléaires dupliquées chez *Arabidopsis thaliana*

Nathalie Durut

► **To cite this version:**

Nathalie Durut. Etudes fonctionnelles des protéines nucléaires dupliquées chez *Arabidopsis thaliana*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Perpignan, 2014. Français. NNT : 2014PERP1208 . tel-01147137

**HAL Id: tel-01147137**

**<https://theses.hal.science/tel-01147137>**

Submitted on 29 Apr 2015

**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.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par  
**UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**

Préparée au sein de l'école doctorale  
« Energie Environnement » ED 305  
Et de l'unité de recherche UMR CNRS 5096

Spécialité : **Biologie Moléculaire**

Présentée par **Melle Nathalie Durut**

**Etude fonctionnelle des gènes dupliqués de la  
nucléoline chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 8 décembre 2014 devant le jury composé de :



Dr Jean-Marc DERAGON, Pr. d'Université, UMR-CNRS 5096, Perpignan

Membre du Jury

Dr Frédy BARNECHE, CR1, UMR 8197 IBENS, Paris

Rapporteur

Dr Moussa BENHAMED, MCF, UMR-CNRS 8618, Paris

Rapporteur

Dr Philippe BOUVET, Pr. d'Université, UMR-USR 3010 ENS, Lyon

Examineur

Dr Cristel CARLES, MCF, UMR-CNRS 5168, Grenoble

Examineur

Dr Anthony HENRAS, CR1, UMR-CNRS 5099, Toulouse

Invité

Dr Julio SAEZ-VASQUEZ, DR2, UMR-CNRS 5096, Perpignan

Directeur de thèse



# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par  
**UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**

Préparée au sein de l'école doctorale  
« Energie Environnement » ED 305  
Et de l'unité de recherche UMR CNRS 5096

Spécialité : **Biologie Moléculaire**

Présentée par **Melle Nathalie Durut**

**Etude fonctionnelle des gènes dupliqués de la  
nucléoline chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 8 décembre 2014 devant le jury composé de :



Dr Jean-Marc DERAGON, Pr. d'Université, UMR-CNRS 5096, Perpignan

Membre du Jury

Dr Frédy BARNECHE, CR1, UMR 8197 IBENS, Paris

Rapporteur

Dr Moussa BENHAMED, MCF, UMR-CNRS 8618, Paris

Rapporteur

Dr Philippe BOUVET, Pr. d'Université, UMR-USR 3010 ENS, Lyon

Examineur

Dr Cristel CARLES, MCF, UMR-CNRS 5168, Grenoble

Examineur

Dr Anthony HENRAS, CR1, UMR-CNRS 5099, Toulouse

Invité

Dr Julio SAEZ-VASQUEZ, DR2, UMR-CNRS 5096, Perpignan

Directeur de thèse



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci pour votre discussion et les remarques très pertinentes à propos de mes travaux.

Je tiens également à remercier Jean-Marc Deragon de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour avoir présidé mon jury de thèse.

Un ENORME MERCI à mon directeur de thèse : Julio Sáez-Vásquez (j'ai mis les accents pour une fois !). Vous êtes un excellent encadrant ! Merci pour m'avoir accordée votre confiance depuis maintenant 6 ans (eh oui !) et d'avoir accepté de faire ce petit chemin avec moi. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre écoute, votre soutien et votre patience ainsi que pour tous les conseils que vous m'avez apportés. Merci également aux nombreuses discussions scientifiques et autres que nous avons pu avoir ! Grâce à vous et aux autres membres du laboratoire, j'ai réalisé ma thèse dans d'excellentes conditions. D'un point de vue personnel, je tiens à vous dire tout simplement merci pour votre simplicité et surtout vos qualités humaines ! J'ai beaucoup apprécié à travailler avec vous.

Merci également à Frédéric. P. Même si tu n'étais pas mon encadrant, tu m'as beaucoup apportée. Merci de m'avoir fait profiter de ton savoir et de ton expérience. Merci aussi pour ta bonne humeur, tes conseils et ta disponibilité. Par contre, je ne te remercie pas pour cet encombrement de paille ! Mais bon, tu es tout pardonné...

Un grand merci à Anne ! Une vraie petite maman ! Toujours disponible et à l'écoute. Merci pour tous ces petits coups de pouce et pour m'avoir soutenue dans les bons comme dans les moments les plus difficiles. Tu es super, ne change surtout pas ! Merci à Pascal pour ta bonne humeur, ta joie, ton dynamisme et ta gentillesse ! Merci également de m'avoir « initiée » depuis la licence 1 à la biologie. Edouard, Sophie, Cyril, Adrien (le dernier arrivé !), merci pour votre sympathie et convivialité. Sophie, je m'excuse de ne pas toujours (voire presque jamais) goûter à tes délicieuses pâtisseries ... mais c'est parce que j'attends avec impatience tes chouquettes ! Laurent, merci pour ta fraîcheur et la bonne ambiance que tu apportes dans le bureau ! Merci pour ces moments de discussion sur tout et n'importe quoi ! Enfin, merci à tous les membres de mon équipe pour avoir supporté mon sale caractère ! J'ai eu beaucoup de chance de tomber sur des personnes comme vous. Je sais bien que je vais beaucoup vous manquer mais ne me remplacez pas trop vite...

Merci à tous les membres du laboratoire pour m'avoir accompagnée dans cette aventure !

Sylvie, maintenant, le séquençage bisulfite n'a presque plus de mystère pour moi ! Toujours souriante et disponible, j'ai été très contente de t'avoir rencontrée. Je te remercie également pour m'avoir soutenue et conseillée tout au long de ces années. Michèle, merci pour toutes les séquences réalisées en un temps record ! J'avoue, je t'ai fait (un peu) courir quand même, mais tu as su tenir le rythme ! Merci beaucoup. Dominique et Jacinthe, merci d'avoir toujours répondu présentes à mes questions. Claire, merci pour ta gentillesse et pour m'avoir accordée un peu de temps pour me former au microscope confocal. Ma petite VAly, merci pour ta douceur, tes encouragements et tous tes précieux conseils !

Jean-Jacques, le Sage ! Un grand merci pour ces très nombreuses discussions et tous tes conseils ! J'espère pouvoir dans un futur proche rester aussi calme que toi ! En tout cas, je vous souhaite à toi et Jacinthe beaucoup de bonheur et de joie notamment avec cet heureux évènement qui arrive à grand pas...

*Richard, l'écossais ! Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci d'avoir toujours répondu présent à questions, mes répétitions et pour la correction de mon anglais. Malgré vous, richard et Jean-Jacques vous étiez dans le bureau face au mien : désolé pour ces petits moments où ma voix s'emportait légèrement (et souvent sur Julio)...*

*Merci à Laëtitia et Véronique ! Que de bons moments ensemble : discussions, rigolades... Je vous adore, restez comme vous êtes ! Véro, fait moi plaisir, prend un peu confiance en toi (je sais c'est moi qui dit ça ! mais c'est plus facile de donner des conseils que de les appliquer !).*

*Merci également à Odile, Elisabeth, Myriam et Jean-René qui ne traînent pas en blouse blanche mais qui apportent énormément à la convivialité du laboratoire !*

*Merci à tous d'avoir partagé ces quelques années avec moi. Votre accueil, sympathie et générosité restera inoubliable ! J'espère pouvoir travailler dans une atmosphère semblable dans l'avenir.*

*Et finalement, mais le plus important, un ENOOOORME merci à ma famille pour m'avoir soutenue et avoir cru en moi jusqu'à la fin. Je vous témoigne toute ma gratitude pour le soutien et les encouragements dont vous m'avez fait part pendant toutes mes années d'étude et tout au long de ma thèse. Merci d'avoir supporté ou plutôt enduré tous mes états d'âme, mon comportement pas toujours des plus agréable... sans pour autant m'en tenir compte. Merci...*

*Le plus court chemin d'une personne à une autre...*

*C'est un brin de gentillesse.*

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>TABLE DES MATIERES</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Préface</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Introduction générale</b>   | <b>8</b>  |
| <b>I- Le Nucléole</b>  | <b>9</b>  |
| A- Le nucléole, lieu de la biogenèse des ribosomes                           | 9         |
| 1- Historique du nucléole  | 9         |
| 2- Organisation structurale et fonctionnelle du nucléole                     | 10        |
| a- Organisation structurale du nucléole                                      | 10        |
| b- Organisation fonctionnelle du nucléole                                    | 11        |
| 3- Dynamique et assemblage du nucléole                                       | 12        |
| 4- Dynamique des composants nucléolaires                                     | 14        |
| B- Le nucléole, un compartiment plurifonctionnel                             | 15        |
| 1- La biogenèse des ribosomes  | 15        |
| 2- Le nucléole et le « métabolisme » des ARN                                 | 16        |
| 3- Le nucléole et la réponse au stress                                       | 17        |
| 4- Rôle du nucléole dans la senescence                                       | 18        |
| 5- Le nucléole et l'organisation nucléaire                                   | 19        |
| 6- Rôle du nucléole dans l'infection virale et les maladies                  | 20        |
| <b>II- Les gènes d'ARN ribosomiques</b>                                      | <b>21</b> |
| A- Organisation des gènes ribosomiques (ADNr)                                | 21        |
| 1- Les gènes ribosomiques  | 21        |
| 2- Organisation des ADNr 45S   | 22        |
| 3- Importance des ADNr dans la stabilité du génome                           | 24        |
| B- Transcription des gènes ribosomiques 45S                                  | 25        |
| 1- Deux types de gènes ribosomiques : des gènes actifs et des gènes inactifs | 25        |
| 2- Transcription par l'ARN Pol I et les facteurs de transcription            | 26        |
| a- Promoteur des gènes d'ARNr  | 26        |
| b- Facteurs de transcription et ARN Pol I                                    | 27        |
| C- Mécanismes de régulation de la transcription                              | 29        |
| 1- Régulation du taux de transcription                                       | 29        |
| 2- Régulation du nombre de gènes d'ARNr actifs                               | 31        |
| a- Les ADNr existent sous deux états chromatiniens                           | 31        |
| b- La Dominance Nucléolaire  | 32        |
| c- Modification du ratio de gènes ON/OFF : régulation épigénétique           | 34        |
| 1) Les modifications chimiques de l'ADN et des histones                      | 35        |
| 2) Remodelage de la chromatine   | 37        |
| 3) Les histones chaperonnes et la composition du nucléosome                  | 40        |
| <b>III- La Nucléoline</b>  | <b>41</b> |
| A- Découverte et description de la nucléoline                                | 41        |
| 1- Organisation et structure de la nucléoline                                | 41        |

|  |  |            |
|--|--|------------|
| 2-   | Localisation de la nucléoline  | 43         |
| 3-   | Modifications post traductionnelles de la nucléoline                                   | 44         |
| B-   | La nucléoline : une protéine multifonctionnelle  | 45         |
| 1-   | La nucléoline et la biogenèse des ribosomes  | 45         |
| 2-   | Les autres fonctions cellulaires de la nucléoline                                      | 48         |
| a-   | La nucléoline et les ARNm  | 48         |
| b-   | La nucléoline et le métabolisme de l'ADN   | 49         |
| c-   | La nucléoline et le stress   | 50         |
| d-   | La nucléoline et la régulation transcriptionnelle ARN Pol II                           | 51         |
| e-   | La Nucléoline et la chromatine   | 52         |
| C-   | La nucléoline chez les plantes   | 54         |
| <b>IV-</b>   | <b>Review : " Nucleolin : Dual roles in rDNA chromatin transcription"</b>              | <b>56</b>  |
| <b>V-</b>  | <b>Objectifs de thèse</b>  | <b>57</b>  |
| <b>Résultats</b>   |  | <b>58</b>  |
| <b>Partie I : Implication de la protéine NUC2 dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr 45S chez <i>A. thaliana</i>.</b> |  | <b>59</b>  |
| A-   | Article publié dans <i>Plant Cell</i>  | 60         |
| B-   | Analyses complémentaires   | 61         |
| 1-   | Analyse générationnelle des lignées <i>nuc2-2::gNUC2</i>                               | 61         |
| 2-   | Analyses générationnelles des lignées rétro-croisées                                   | 62         |
| 3-   | Analyses moléculaires complémentaires  | 64         |
| <b>Partie II : Le gène <i>NUC2</i> est induit en réponse au stress</b>   |  | <b>66</b>  |
| A-   | Article en préparation   | 67         |
| B-   | Résultats complémentaires  | 83         |
| 1-   | Analyse phénotypique des mutants <i>nuc2</i> en réponse au stress thermique            | 83         |
| 2-   | Le niveau de méthylation du gène <i>NUC2</i> n'est pas affecté en réponse à la chaleur | 84         |
| 3-   | Les gènes d'ARNr en réponse au stress thermique  | 85         |
| <b>Partie III : Résultats complémentaires</b>  |  | <b>86</b>  |
| A-   | Purification des protéines recombinantes nucléoline et histones                        | 87         |
| B-   | Analyse de la longueur des télomères dans les mutants <i>nucléoline</i>                | 89         |
| <b>Discussion générale</b>   |  | <b>93</b>  |
| <b>Matériels et Méthodes</b>   |  | <b>106</b> |
| <b>I- Matériel</b>   |  | <b>107</b> |
| A-   | Matériel végétal   | 107        |
| B-   | Souches bactériennes   | 107        |
| C-   | Milieux de culture   | 107        |
| <b>II- Méthodes de physiologie végétale</b>  |  | <b>108</b> |
| A-   | Culture du matériel végétal  | 108        |
| B-   | Croisements  | 109        |
| C-   | Transformation des plantes par <i>A. tumefaciens</i>                                   | 109        |
| <b>III- Méthodes de biologie moléculaire</b>   |  | <b>110</b> |
| A-   | Techniques relatives à l'ADN   | 110        |
| 1-   | Extraction de l'ADN  | 110        |

|    |  |     |
|----|--|-----|
| a- | Extraction d'ADN génomique   | 110 |
| b- | Extraction d'ADN plasmidique                                       | 111 |
| 2- | Electrophorèse   | 111 |
| 3- | PCR  | 112 |
| 4- | Méthode de clonage   | 113 |
| 5- | Séquençage   | 115 |
| 6- | Etude de la méthylation de l'ADN                                   | 116 |
| a- | Séquençage bisulfite   | 116 |
| b- | Digestion McrBC  | 117 |
| 7- | FANoS  | 118 |
| 8- | Analyse de la longueur des télomères par Southern bot              | 118 |
| a- | Méthode TRF « Telomere Restriction Fragment » :                    | 118 |
| b- | Méthode PETRA « Primer Extension Telomere Repeat Amplification » : | 119 |
| 9- | EMSA « Electrophoretic Mobility Shift Assay »                      | 120 |
| B- | Techniques relatives à l'ARN                                       | 121 |
| 1- | Extraction d'ARN   | 121 |
| 2- | Migration des ARN sur Gel  | 121 |
| 3- | Traitement des ARN à la DNase                                      | 122 |
| 4- | Réaction de Transcription Réverse                                  | 122 |
| 5- | Extension d'amorce   | 123 |
| 6- | Northern blot  | 125 |
| C- | Techniques relatives aux protéines                                 | 126 |
| 1- | Extraction des protéines   | 126 |
| 2- | Electrophorèse SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis)   | 126 |
| 3- | Coloration du gel au bleu coomassie                                | 127 |
| 4- | Western blot   | 127 |
| 5- | Production des protéines recombinantes Histones                    | 128 |
| D- | Analyses histologiques   | 129 |
| 1- | Immunocytologie  | 129 |
| 2- | FISH   | 130 |

**Références** **131**



## Liste des abréviations

|  |  |
|--|--|
| <b>ABA:</b> Acide Abscissique                                      | <b>FRET:</b> Fluorescence Resonance Energy Transfert             |
| <b>ABRE:</b> Abscisic Acid Responsive Element                      | <b>GAR:</b> Glycine- and Arginine- Rich                          |
| <b>ACF:</b> ATP-dependent Chromatin assembly and remodeling Factor | <b>GC:</b> Granular Component                                    |
| <b>AMPK:</b> AMP-Activated Protein Kinase                          | <b>GFP :</b> Green Fluorescent Protein                           |
| <b>ARF:</b> Alternative Reading Frame                              | <b>GRV:</b> Groundnut Rosette Virus                              |
| <b>ARN Pol:</b> ARN polymérase                                     | <b>HAT:</b> Histone Acétyl-Transférase                           |
| <b>Asf1:</b> Anti silencing function 1                             | <b>HDAC:</b> Histone déacétylase                                 |
| <b>CAF:</b> Chromatin Assembly Factor 1                            | <b>HDM:</b> Histone déméthylase                                  |
| <b>CBP:</b> CREB-Binding Protein                                   | <b>HMG:</b> High Mobility Group                                  |
| <b>CF:</b> Core Factor   | <b>HMT:</b> Histone methyl-Transférase                           |
| <b>CK:</b> Caseine Kinase  | <b>HP1:</b> Heterochromatin Protein 1                            |
| <b>CMoV:</b> Carrot Mottle Virus                                   | <b>HR:</b> Homologous Recombination                              |
| <b>CMV:</b> CytoMegalovirus.                                       | <b>HSE:</b> Heat shock Element                                   |
| <b>CNV:</b> Copy Number Variation                                  | <b>HSP70:</b> Heat Shock protein 70                              |
| <b>CPE:</b> Core Promoter Element                                  | <b>hTERT:</b> human Telomerase Reverse Transcriptase             |
| <b>CREB:</b> C-AMP Response Element Binding protein                | <b>hTR:</b> human Telomerase RNA                                 |
| <b>CSA:</b> Cockayne Syndrome protein A                            | <b>IGS:</b> Intergenic Sequence                                  |
| <b>CSB:</b> Cockayne Syndrome group B                              | <b>ITS:</b> Internal Transcribed Spacer                          |
| <b>DC:</b> Detention center  | <b>JNK:</b> c-Jun N-Terminal Kinase                              |
| <b>DDM1:</b> Deficient in DNA Methylation 1                        | <b>LAD:</b> Lamina Associated Domain                             |
| <b>DFC:</b> Dense Fibrillar Component                              | <b>LTRE:</b> Low Temperature Responsive Element                  |
| <b>DNMT:</b> DNA MethylTransferase                                 | <b>LVS:</b> Live Vaccine Strain                                  |
| <b>DRE :</b> Drought Response Element                              | <b>MBD:</b> Methyl Binding Domain                                |
| <b>DSB:</b> Double Strand Break                                    | <b>MDM2:</b> Mouse Double Minute 2                               |
| <b>EJC:</b> Exon Junction Complex                                  | <b>MMLV:</b> Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase |
| <b>eNoSC:</b> energy-dependent Nucleolar Silencing Complex)        | <b>NAC:</b> Nucleolus Associated Chromatin                       |
| <b>ERK:</b> Extracellular signal Regulated Kinase                  | <b>NAD:</b> Nucleolus Associated chromatin Domain                |
| <b>ETS:</b> External transcribed Spacer                            | <b>NAP:</b> Nucleosome Assembly Protein 1                        |
| <b>FACT:</b> Facilitates Chromatin Transcription                   | <b>NES:</b> Nuclear Export Signal                                |
| <b>FC:</b> Fibrillar Center  | <b>NHEJ:</b> Non-Homologous End-Joining                          |
| <b>FLIP:</b> Fluorescence Loss In Photobleaching                   | <b>NLS:</b> Nuclear Localization Signal                          |
| <b>FOB1:</b> Fork Blocking protein 1                               | <b>NML:</b> Nucléométhylène                                      |
| <b>FRAT:</b> Fluorescence Recovery After Photobleaching            |  |

**NOR:** Nucleolus Organizer Region  
**NoRC:** Nucleolar Remodeling Complex  
**NPM:** Nucléophosmine  
**NRE:** Nucleolin Recognition Element  
**NRP:** Nucleolin Related Protein  
**ORF:** Open Reading Frame  
**PC:** Psoralen Crosslinking  
**PCAF:** P300/CBP-associated factor  
**PETRA:** Primer Extension Telomere Repeat Amplification  
**PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog  
**PIC:** Pre Initiation Complex  
**PNB:** Pre-Nucleolar Body  
**POLD1:** DNA Polymerase catalytic subunit  $\delta$   
**PR:** Protéine Ribosomique  
**RB:** Retinoblastoma  
**RdDM:** RNA directed DNA Methylation  
**RNF8:** Ring Finger Protein 8  
**RPA:** Replication Protein A  
**RRM:** RNA Recognition Motif  
**RSC:** Chromatin Structure Remodeling  
**SA:** Salicylic acid  
**siARN:** Short-Interfering ARN  
**SL1:** Selectivity factor 1

**SP:** Spacer Promoter  
**SRP:** Signal Recognition Particle  
**SSRP1:** Structure-Specific Recognition Protein 1  
**SWI/SNF2:** SWItch/Sucose Non Fermentable  
**TAF:** Transcription Associated Factor  
**TBP:** TATA Binding protein  
**TFII-H:** Transcription Factor II Human  
**TIF-IA:** Transcriptional Initiation Factor IA  
**Tip60:** HIV-1 TAT-interactive protein  
**TIS:** Transcription Initiation Site  
**TMoV:** Tobacco Mottle Virus  
**TOR:** Target of Rapamycin  
**TRF:** Terminal Restriction Fragment  
**TTF-I:** Transcription Terminal Factor I  
**Ty16:** suppressor of Ty  
**UAF:** Upstream Activating Factor  
**UBF:** Upstream Binding Factor  
**UCE:** Upstream Control Element  
**UPE:** Upstream Promoter Element  
**VHL:** Von Hippel-Lindau  
**WNV:** West Nile Virus  
**YFP:** Yellow Fluorescent Protein

## Préface

Chez tous les organismes eucaryotes, la production des ARN ribosomiques (ARNr) est un processus fondamental dans la biogenèse des ribosomes et par conséquent, dans la synthèse protéique. L'expression des gènes ribosomiques, ou ADNr, représente près de 60% de l'activité transcriptionnelle totale de la cellule. Ainsi, la régulation de l'expression de ces gènes se doit d'être permanente et précise d'autant plus que les gènes d'ARNr sont présents en de multiples copies dans le génome. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, notre modèle d'étude, ces gènes représentent à eux seuls près de 5% de la totalité du génome.

La transcription et les différents processus de maturation des précurseurs ARNr donnent naissance au nucléole, le compartiment le plus proéminent du noyau. Considéré pendant longtemps comme « l'usine » dédiée à la biogenèse des ribosomes, le nucléole est un compartiment plurifonctionnel intervenant dans divers processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, le vieillissement ou encore l'assemblage de plusieurs complexes protéiques. Le nucléole joue également un rôle essentiel dans la réponse au stress et est au centre de nombreux échanges entre les différents domaines nucléaires.

Au cours des dernières années, différents travaux menés sur l'expression des ADNr ont permis de mettre en évidence l'importance de l'organisation chromatinienne de ces gènes dans leur expression. Des modifications chimiques de l'ADN et des histones, régulent l'expression des gènes *via* la formation de structures chromatiniennes plus ou moins compactées. Ces modifications, appelées épigénétiques, jouent un rôle capital dans le contrôle de l'expression des gènes : elles déterminent les populations de gènes dits actifs « ON » des populations de gènes dits inactifs « OFF ». Ainsi, du fait que les principes qui régissent l'expression des gènes d'ARNr sont généralisables à d'autres types de gènes, la dynamique de ces gènes constitue un excellent modèle pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'expression et l'organisation fonctionnelle du génome.

Dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux facteurs impliqués dans la dynamique des gènes ribosomiques chez la plante modèle *Arabidopsis*

*thaliana*. Parmi ces derniers se trouve la Nucléoline, une protéine majoritaire du nucléole, connue pour son rôle historique dans la biogenèse des ribosomes et plus récemment définie comme une histone chaperonne chez les animaux. De façon très intéressante, contrairement aux animaux et aux levures, le génome des plantes possède au moins deux gènes codant les protéines nucléoline. Le gène *NUC1* ayant été caractérisé au laboratoire, je me suis intéressée plus particulièrement à la fonction du deuxième gène *NUC2*, d'une part dans l'expression des gènes ribosomiques et d'autre part, dans la physiologie de la plante.

L'introduction de ce manuscrit présente l'ensemble des connaissances concernant le nucléole et son importance au sein de la cellule, la régulation de l'expression des gènes ribosomiques et le rôle de la nucléoline, protéine impliquée dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Au cours de cette présentation, les différents aspects concernant la dynamique chromatinienne des ADNr seront développés.

# Introduction générale

---

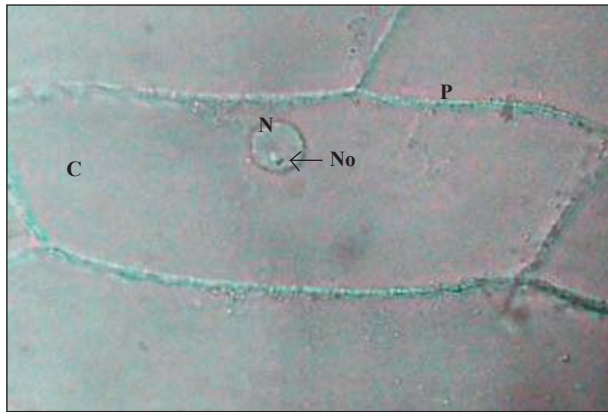
## I- Le Nucléole

### A- Le nucléole, lieu de la biogenèse des ribosomes

#### 1- Historique du nucléole

Le nucléole a été décrit pour la première fois au XVIII<sup>ième</sup> Siècle par Fontana comme étant « un corps oviforme ayant une tâche en son milieu » (Fontana 1781) et près de un demi-siècle plus tard, le nom de « nucléole » lui a été attribué (Valentin 1836). Visible en microscopie optique, le nucléole a été l'une des premières structures nucléaires observées définie comme étant un organite nucléaire. En 1932, l'invention du microscope électronique représenta une véritable avancée technique qui permît la description de sa structure interne. Ce dernier n'est alors plus défini comme un organite mais plutôt comme un domaine nucléaire puisque aucune membrane ne le délimite du noyau (Figure 1). Dans les mêmes années, Heitz et Barbara McClintock attribuent une origine chromosomique au nucléole : ils décrivent une relation existant entre la structure du nucléole et la présence de constriction secondaires sur certaines paires de chromosomes au cours du cycle cellulaire. Ces *loci* chromosomiques sont alors désignés sous le terme de « Nucleolus Organizer Region » (NOR) (Heitz 1931; McClintock 1934).

C'est avec l'évolution des techniques que le rôle du nucléole fut petit à petit compris et associé à la biogenèse des ribosomes. Dans les années 1940, la présence de grandes quantités d'ARN dans le nucléole a été mise en évidence (Caspersson and Schultz 1940). Vingt ans plus tard, divers travaux montrent que les gènes ribosomiques 18S, 5.8S et 25/28S (ADNr 45S) sont localisés dans les NORs et que la synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) se déroule dans le nucléole (Perry and Errera 1961; Perry 1962; Brown and Gurdon 1964; Ritossa and Spiegelman 1965; Miller and Beatty 1969). Grâce à l'utilisation de techniques de coloration à l'argent, des protéines argyrophiliques nommées « Ag-NOR » sont également retrouvées associées aux NORs actifs, c'est-à-dire ceux contenant les ADNr transcrits (Mosgoeller 2004). Le terme d'« usine à ribosome » entre alors dans la communauté scientifique pour définir le rôle du nucléole dans la biogenèse des ribosomes et plus particulièrement dans la transcription et la maturation des ARNr ainsi que dans leur assemblage avec les protéines ribosomiques (Shaw and Jordan 1995).



**Figure 1 :** Observation au microscope optique d'une cellule d'oignon (X 600)

Photographie d'une cellule d'oignon en microscopie optique. La cellule végétale est entourée par la paroi pecto-cellulosique (P). Le Noyau (N) est séparé du cytoplasme (C) par une membrane. Le nucléole (No) apparaît comme une structure bien définie au sein du noyau.

## 2- Organisation structurale et fonctionnelle du nucléole

### a- Organisation structurale du nucléole

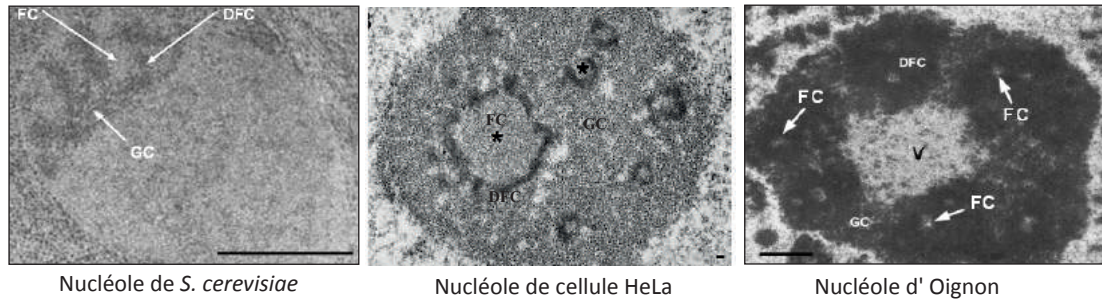
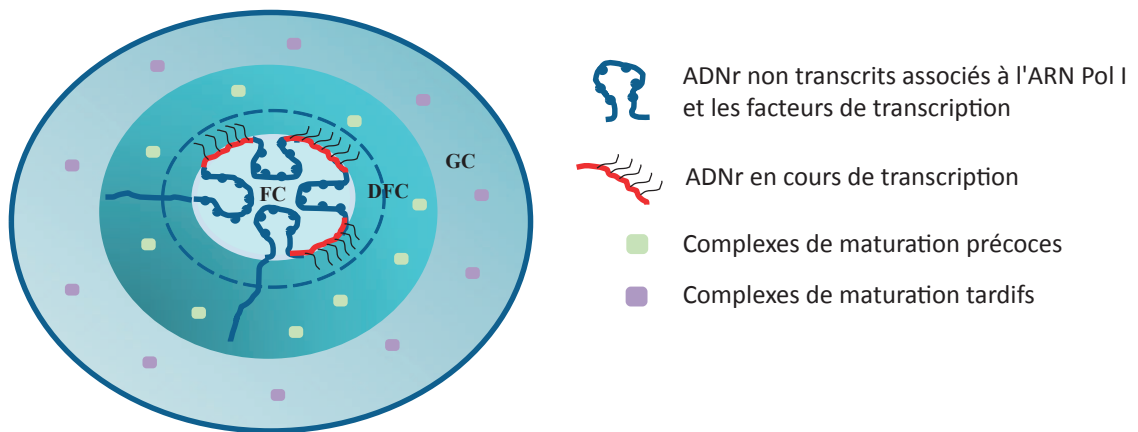
Le nucléole présente une structure hétérogène définie selon les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. D'après les observations microscopiques, trois sous compartiments, organisés de façon concentrique, structurent le nucléole dans les cellules en interphase (Jordan 1984) (Figure 2A):

- Le centre fibrillaire (FC)
- Le composé fibrillaire dense (DFC)
- Le composé granulaire (GC)

Le FC, peu dense au microscope électronique, apparaît en forme circulaire. Il ne représente, généralement, qu'une faible fraction du volume nucléolaire. Le DFC entourant le FC, au contraire, est plus dense en microscopie électronique (Jordan 1984). En phase de croissance, il forme une sorte de réseau créant des protubérances dans le FC qui peuvent s'étendre jusque dans le noyau (Junera et al. 1995). Le FC et le DFC sont enveloppés par une masse granuleuse, le GC qui constitue le reste du nucléole. Chez les espèces végétales, un quatrième composant structure le nucléole : la cavité nucléolaire (ou vacuole par abus de langage), facilement identifiable en raison de sa très faible densité (Morena-Dias de la Espina et al. 1980; Stepinski 2014).

Cependant, il semblerait que seuls les organismes pluricellulaires partagent cette organisation. En effet, d'après plusieurs travaux, seulement deux sous compartiments formeraient le nucléole chez la levure: le DFC et le GC (Thiry and Lafontaine 2005). Pourtant, des structures très similaires aux FCs ont été observées (Leger-Silvestre et al. 1999), toutefois, ces dernières correspondraient aux interstices nucléolaires observés chez les animaux. L'hypothèse émise est que l'apparition du FC s'est produite au cours de l'évolution. En effet, les organismes possédant des gènes ribosomiques ayant de petites séquences inter géniques présentent une structure bipartite alors que les organismes ayant de plus grandes séquences inter géniques possèdent des nucléoles avec une structure tripartite (Thiry and Lafontaine 2005). L'augmentation de la taille des séquences a probablement induit la



**A****B**

**Figure 2 :** Structure et organisation fonctionnelle du nucléole

**A :** Observation au microscope électronique de nucléoles de levure (*S. cerevisiae*), de cellule humaine (HeLa) et de plante (Oignon). Le FC représente le centre fibrillaire, le DFC, le composé fibrillaire dense et le GC, le composé granulaire (Gonzalez-Camacho and Medina, 2006; Hernandez-Verdun, 2006; Trumtel et al., 2000). La barre d'échelle représente 500 nm.

**B :** Schéma représentant la structure et l'organisation fonctionnelle du nucléole chez les eucaryotes supérieurs. Le nucléole est composé du centre fibrillaire (FC) entouré du composé fibrillaire dense (DFC) lui-même encerclé par le composé granulaire (GC). A l'intérieur du FC se trouve les ADNr inactifs ainsi que les facteurs transcriptionnels (ARN Pol I et facteurs de transcription). La transcription des gènes ribosomiques se déroule à la jonction FC/DFC. Les transcrits naissants sont alors pris en charge par les complexes de maturation présents dans le DFC puis, par la suite, dans le GC où ces derniers seront assemblés aux protéines ribosomiques pour former les particules pré-ribosomiques presque matures. Les derniers évènements de maturation et d'assemblage donnant lieu à un ribosome fonctionnel se déroulent dans le cytoplasme.

formation de boucles qui se sont retrouvées exclues du nucléole (jusqu'à présent composé de deux compartiments) et ont formé un troisième compartiment : le FC.

#### b- Organisation fonctionnelle du nucléole

L'organisation du nucléole est corrélée à la biogenèse des ribosomes : à chaque étape de la biogenèse des ribosomes est attribué un compartiment nucléolaire. Ainsi, l'arrangement du nucléole suit un processus vectoriel c'est-à-dire qu'une fois que la transcription est initiée, les différentes étapes s'enchaînent de façon centrifuge (Figure 2B).

Bien que la fonction du nucléole dans la biogenèse des ribosomes soit indéniable, beaucoup de controverses sont survenues pendant près de 20 ans concernant le lieu de la transcription des gènes ribosomiques. En effet, chez les mammifères, l'utilisation du « pulse-chase », associé au marquage au Br-UTP des ARNr néo-transcrits, a permis de localiser les précurseurs ARNr au sein du FC avant leur migration vers la périphérie FC/DFC (Thiry et al. 2000). Au contraire, les techniques d'immuno-marquage ou encore d'hybridation *in situ* ont permis de détecter les ARNr néo-transcrits dans le DFC et à la périphérie FC/DFC (Koberna et al. 2002). Par ailleurs, l'ARN Pol I ainsi que le facteur de transcription UBF (Upstream Binding Factor) ont été localisés dans le DFC ce qui suggère que la transcription se déroule au sein de ce compartiment (Cmarko et al. 2000). Aujourd'hui, un consensus propose que la transcription des gènes d'ARNr est localisée à la jonction du FC/DFC et dans le DFC où des transcrits naissants sont formés et associés à des protéines (Raska et al. 2006a) (Figure 2B). La transcription basale observée dans le FC pourrait, quant à elle, jouer un rôle dans la formation de transcrits inter géniques ou ARN non codants, impliqués dans la régulation de l'expression des ADNr ainsi que dans la réponse au stress (Mayer et al. 2006b; Santoro et al. 2010; Schmitz et al. 2010; Audas et al. 2012a; Jacob et al. 2013).

Le DFC est également le lieu des premières étapes de la maturation des pré-ARNr (Shaw et al. 1995). En effet, des précurseurs ARNr sont détectés (grâce au marquage au Br-UTP) ainsi que de nombreuses protéines intervenant dans le processus de maturation telles que la fibrillarine ou encore la nucléoline (de Carcer and Medina 1999; Cmarko et al. 2000; Thiry and Lafontaine 2005). D'autre part, certaines protéines ribosomiques s'assemblent aux précurseurs ARNr au cours de la transcription ce qui suggère que l'assemblage des particules ribosomiques débute dans le DFC (Woolford and Baserga 2013).

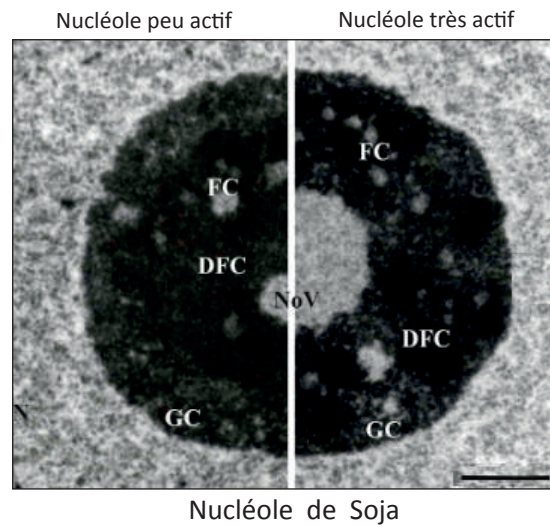
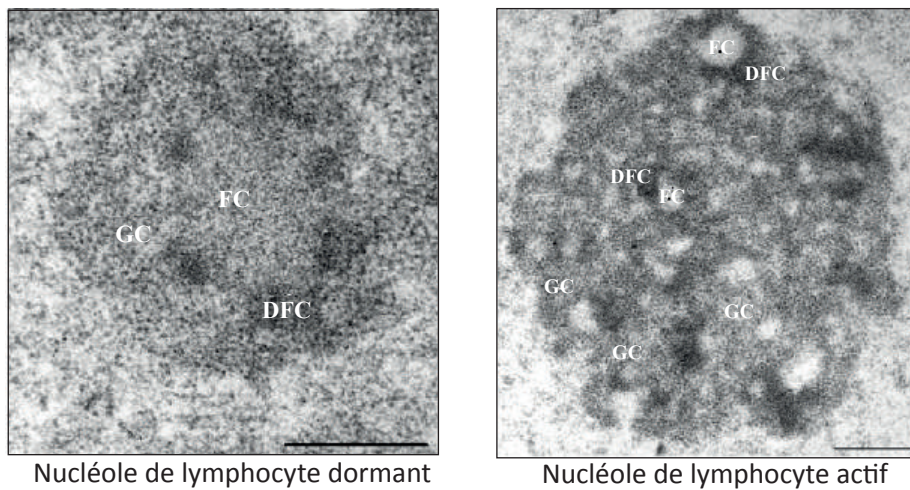
Le GC est le dernier compartiment nucléolaire dans lequel migrent les précurseurs ARNr. Différentes étapes de maturation des pré-ARNr, des protéines ribosomiques ainsi que l'assemblage des pré-particules s'y déroulent dans la continuité de ceux ayant commencé dans le DFC (Shaw et al. 1995; Kruger et al. 2007). La formation des pré-particules donne naissance aux granules, observées en microscopie électronique, d'où l'appellation de composé granulaire. Ces particules pré-ribosomiques, à différents stades d'assemblages sont stockées au sein du GC avant d'être dirigées vers le cytoplasme où les dernières étapes de maturation seront réalisées (Hernandez-Verdun 2006; Zemp and Kutay 2007; Lo et al. 2010; Preti et al. 2013).

Le nombre et la taille de cavités nucléolaires sont corrélés à l'activité du nucléole. Plus l'activité transcriptionnelle du nucléole est importante, plus le nombre de cavités diminue mais plus leur taille augmente (Figure 3A). Par ailleurs, divers travaux suggèrent que cette cavité est aussi le lieu de séquestration et d'accumulation de snARN (Beven et al. 1996), d'éléments du système ubiquitine - protéasome (Stepinski 2012a) ainsi que de certaines protéines du complexe « Exon Junction Complex » (EJC) déposé au cours de l'épissage (Pendle et al. 2005; Brown and Shaw 2008).

### **3- Dynamique et assemblage du nucléole**

La formation du nucléole repose sur le concept de : « The act of building a ribosome » (Melese and Xue 1995). Le nucléole est un compartiment dynamique qui évolue en fonction d'un grand nombre de facteurs tel que l'activité et le cycle cellulaire, l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol I, les facteurs biotiques et abiotiques...(Risueno and Medina 1986; Derenzini et al. 2000; Medina et al. 2000; Hernandez-Verdun et al. 2002; Stepinski 2009).

Dès les premières études du nucléole, il est ressorti que la taille du nucléole était modifiée en fonction de l'activité cellulaire (Freud 1881). Plus tard, le développement d'outils d'analyses tels que la microscopie électronique a permis d'observer une corrélation entre la dynamique du nucléole et l'activité cellulaire. Par exemple, dans une cellule lymphocytaire dite « inactive », c'est-à-dire où la production en ribosome est limitée, le nucléole est composé d'un grand FC entouré d'un fin DFC contenant des intrusions de chromatine. Lorsque la cellule devient active, le volume du GC diminue et des intrusions du

**A****B****Figure 3** : Structure du nucléole et activité cellulaire

Photographies au microscope électronique de nucléoles montrant la réorganisation fonctionnelle après activation de la cellule. **A** : Nucléole de plantes (Soja) : A gauche, nucléole peu actif avec un faible nombre de FCs et une petite cavité nucléolaire. A droite, un nucléole avec une forte activité transcriptionnelle possédant plusieurs petits FCs et une grande cavité nucléolaire centrale (Stepinski, 2014). La barre d'échelle indique 2  $\mu$ m.

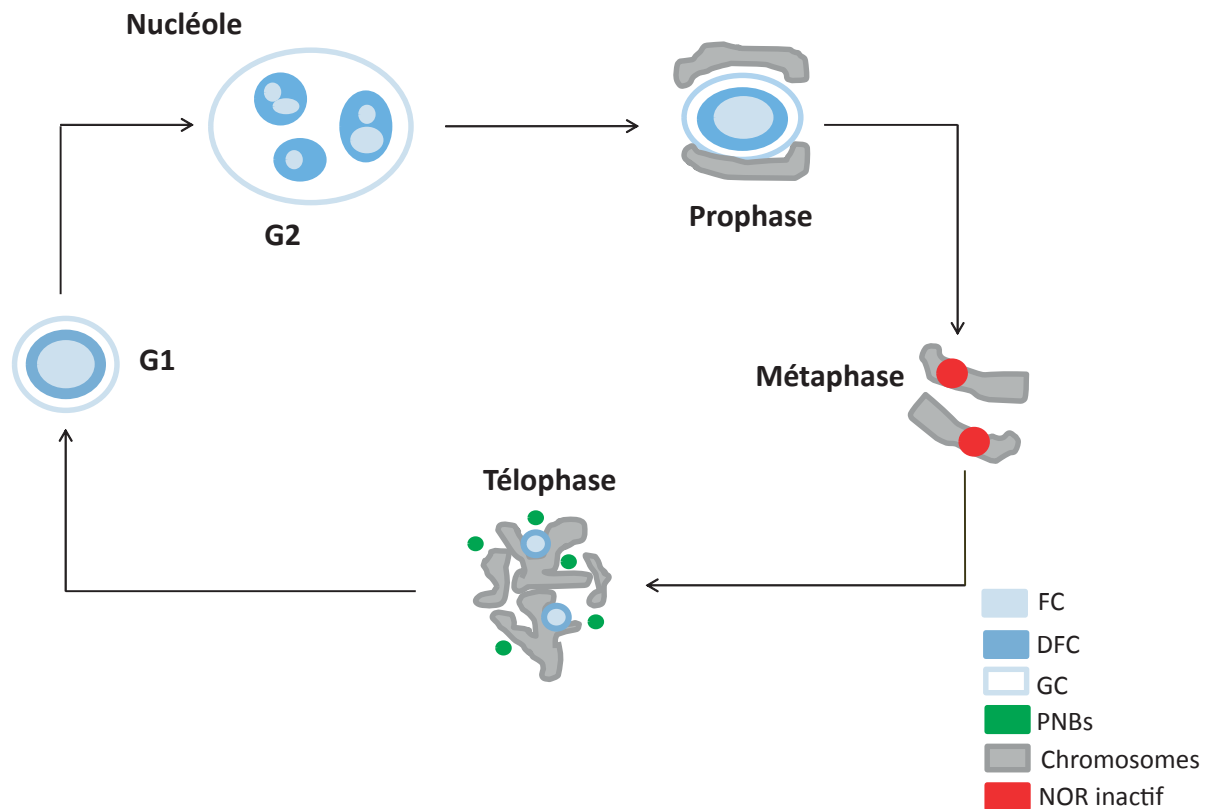
**B** : Lymphocyte humain avant et après stimulation. A gauche, un lymphocyte dormant ou inactif. Le FC est très large et entouré d'un fin DFC et d'un large GC. A droite, un lymphocyte activé après 48 h de stimulation (photo-hématoglobuline). Le GC est fortement réduit en raison de la mobilisation des particules pré-ribosomiques vers le cytoplasme. Plusieurs petits FCs sont détectés avec des intrusions de DFC (Raska et al., 2004). La barre d'échelle indique 500 nm.

DFC divisent le FC qui devient alors de moins en moins visible. En fin d'activité cellulaire, le nucléole retrouve une forme « inactive », comme décrite un peu plus haut (Figure 3B et (Wachtler et al. 1980; Hozak et al. 1989; Wachtler et al. 1990)).

La structure du nucléole est aussi modifiée au cours du cycle cellulaire ; plus particulièrement pendant la mitose (Figure 4).

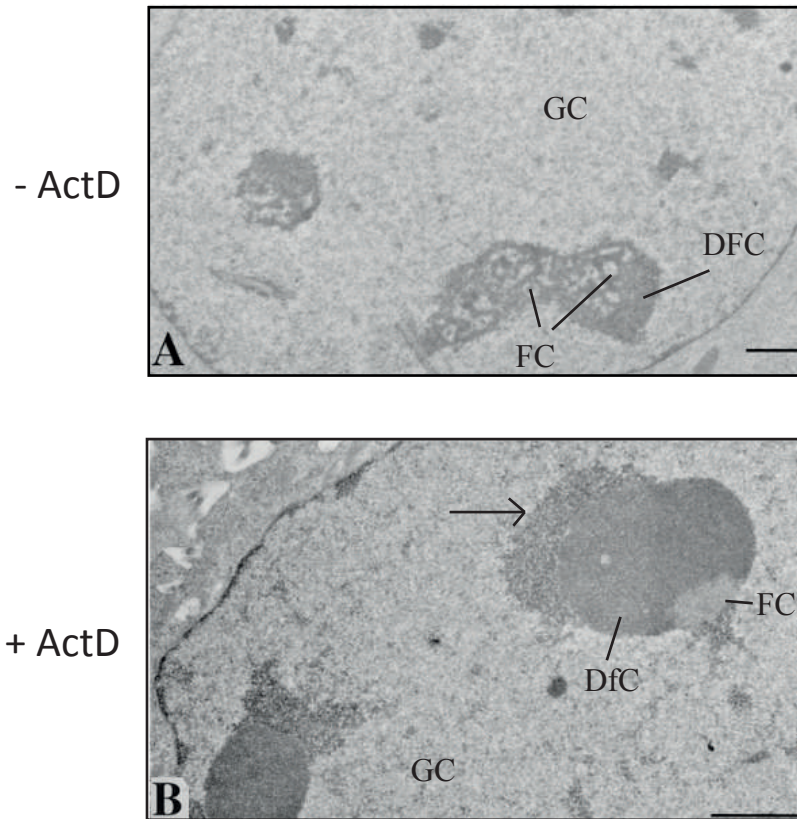
Au début de la mitose, le nucléole commence à se désagréger et disparaît totalement en fin de prophase (Sirri et al. 2008). La transcription et la maturation des pré-ARNr sont inhibées par la kinase CDK1-cycline B (Dundr and Olson 1998; Sirri et al. 2000). Les facteurs de transcription UBF, SL1 (Selectivity factor I) et TTF-I (Transcription Termination Factor I) restent associés aux gènes d'ARNr tout en étant maintenus dans un état inactif par la CDK1 (Roussel et al. 1996; Heix et al. 1998; Sirri et al. 1999; Sirri et al. 2000). Les protéines nucléolaires, impliquées dans la maturation des pré-ARNr, sont, quant à elles, redistribuées à la périphérie des chromosomes (Peter et al. 1990; Sirri et al. 2008). A la fin de la mitose, l'inhibition de la CDK1 permet de rétablir l'activité de l'ARN Pol I (Sirri et al. 2000). De nouveaux complexes se forment : les corps pré-nucléolaires (PNBs), composés de l'ensemble des protéines et petits ARN impliqués dans la maturation des précurseurs ARNr (Dundr et al. 2000). Les protéines sont alors recrutées progressivement puis échangées entre le nucléole et les PNBs, qui représentent un moyen de contrôle et de régulation de l'assemblage du nucléole (Savino et al. 2001; Muro et al. 2010).

La transcription des ADNr affecte également la structure du nucléole. Par exemple, l'utilisation de l'inhibiteur de la transcription « Actinomycine D » (ActD) conduit d'une part, à la ségrégation des différents composants du nucléole (Figure 5 et (Puvion-Dutilleul et al. 1992; Schofer et al. 1996)) et d'autre part, à la redistribution de l'ensemble des protéines (nucléolaires et nucléoplasmiques) dans des structures localisées à la périphérie du nucléole (Journey and Goldstein 1961; Reynolds et al. 1964; Shav-Tal et al. 2005). Par ailleurs, la diminution du facteur de transcription UBF, nécessaire à la formation du PIC (Pre Initiation Complex) et donc à la transcription, mène à une dissociation du nucléole associée à une condensation des NORs (Grob et al. 2014), ce qui suggère que la transcription est nécessaire au maintien de l'organisation et de la structure du nucléole.



**Figure 4** : Dynamique du nucléole au cours de la mitose

Schéma représentant l'évolution de la structure du nucléole au cours du cycle cellulaire chez les mammifères. A l'interphase (phase G2), la cellule est très active et le nucléole atteint sa taille maximale. En fin de phase G2, le nucléole commence à se désassembler de façon séquentielle : les complexes de maturation sont vidés peu à peu du nucléole induisant une diminution du GC. À l'entrée de la mitose, en prophase, les chromosomes commencent à se condenser. Le GC se réduit suite à la relocalisation des machineries de maturation tardives vers la périphérie des chromosomes et le DFC commence également à disparaître. A partir de la métaphase, le nucléole n'est plus visible. La transcription des gènes d'ARNr est inhibée par la CDK1 (rouge). Cette organisation est conservée tout au long de l'anaphase lorsque les chromosomes migrent aux pôles de la cellule. À partir de la télaphase, les chromosomes se décondensent et la transcription des gènes d'ARNr est à nouveau activée. Les composants nécessaires à la maturation des ARNr sont redistribués dans les PNBs (vert) qui sont redirigés vers les NORs redevenus actifs. Le réassemblage du nucléole en fin de mitose dépend de la coordination à la fois de la transcription des ADNr et du recrutement des complexes de maturation. Un nouveau nucléole commence à se former en phase G1 et devient totalement actif à partir de l'interphase.



**Figure 5 :** Ségrégation des différents compartiments du nucléole suite à l'inhibition de la transcription

Photographie au microscope électronique de nucléoles de cellules humaines (HeLa). **A :** Nucléole en phase G1 en absence de traitement à l'Actinomycine D (ActD). On distingue le FC, DFC et GC. **B :** Nucléole en interphase après traitement à l'ActD (0.04 µg/ml). Les protéines impliquées dans la transcription forment un croissant (indiqué par la flèche) au-dessus du DfC (Dousset et al., 2000). La barre d'échelle représente 1 µm.

#### 4- Dynamique des composants nucléolaires

La plupart des protéines nucléolaires, impliquées dans la biogenèse des ribosomes, ne sont généralement localisées que de façon passagère dans le nucléole (Leung and Lamond 2003). Néanmoins, il n'existe pas de « véritables » séquences consensus permettant d'établir l'adressage de ces protéines au sein du nucléole, bien que quelques peptides aient été identifiés pour certaines protéines (Lohrum et al. 2000; von Kobbe and Bohr 2002; Liu et al. 2006a). Toutefois, l'absence d'un signal précis n'est pas surprenante étant donné qu'aucune membrane ne délimite le nucléole du noyau. *Comment les protéines peuvent-elles alors être localisées dans le nucléole ?* La forte mobilité des protéines nucléolaires ainsi que leur capacité à transiter dans différents compartiments laissent supposer que la localisation nucléolaire est définie par affinité et diffusion. Les protéines sont retenues plus ou moins longtemps dans le nucléole suite à leur interaction avec des ARN et/ou des protéines qui sont impliqués dans les différentes fonctions nucléolaires (Misteli 2001; Raska et al. 2006b; Cmarko et al. 2008). La mise en place de protéines fluorescentes étiquetées ainsi que le développement de différentes techniques : FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) et FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) ont permis d'étudier le mouvement des protéines en temps réel *in vivo* ainsi que leur co-localisation au sein des différents compartiments cellulaires (Phair and Misteli 2001). Un flux constant d'échange de protéines entre le nucléole et le nucléoplasme est alors observé. Il apparaît que le temps de résidence des protéines au sein du nucléole est généralement très court : de l'ordre d'une dizaine de secondes (Raska et al. 2006b).

D'autres études ont également permis de mettre en évidence que la quantité de protéines ribosomiques générée est beaucoup plus importante que celle requise pour la production des ribosomes. Jusqu'à présent, il était admis que l'ensemble de ces protéines étaient exportées vers le nucléoplasme et le cytoplasme pour y être dégradées par le protéasome (Lam et al. 2007; Cmarko et al. 2008). Néanmoins, il a été montré que certaines protéines sont impliquées dans des processus cellulaires autres que ceux associés à la formation des ribosomes (Zhang et al. 2003; Kim et al. 2014). Par exemple, la protéine RPL11 participe à la régulation du taux de protéine P53 (Zhang et al. 2003) et la protéine



ribosomique RPS6, cible de la voie TOR (Target of Rapamycin), est impliquée dans la répression de l'expression des ADNr (Kim et al. 2014).

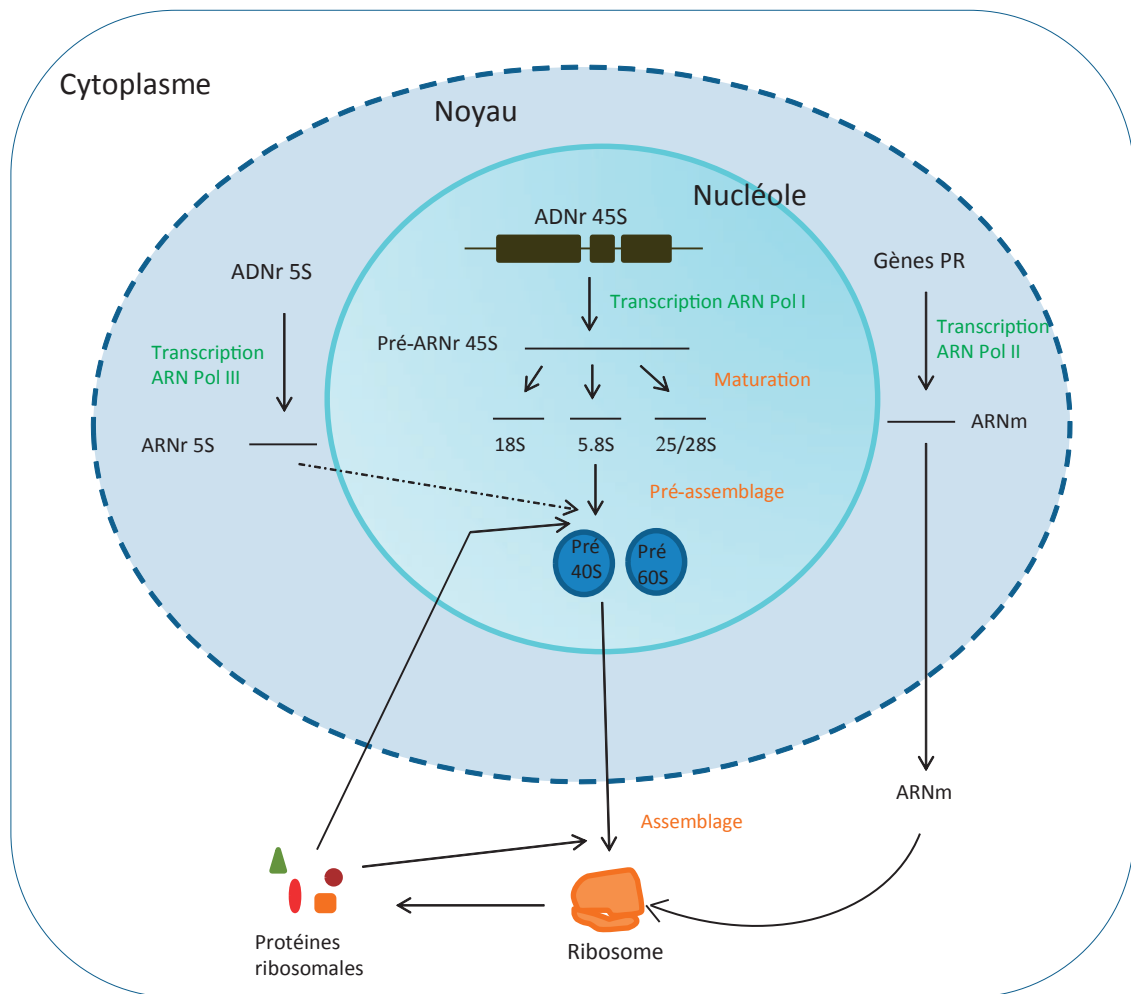
## **B- Le nucléole, un compartiment plurifonctionnel**

Parmi les protéines qui transitent dans le nucléole, plusieurs ne sont pas impliquées dans les activités liées à la biogenèse des ribosomes (Scherl et al. 2002; Andersen et al. 2005; Pendle et al. 2005). Grâce aux données issues de la protéomique, de la littérature ainsi que de la bio-informatique, nous allons voir que le nucléole, de par sa diversité protéique, est un élément essentiel au fonctionnement cellulaire.

### **1- La biogenèse des ribosomes**

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques responsables du processus traductionnel. Véritables acteurs de la synthèse protéique, ils assurent la transition ARN messenger (ARNm)/protéine par décodage du code génétique et fabrication d'une chaîne polypeptidique (Schluenzen et al. 2000). Du fait de leur rôle central dans la traduction, les ribosomes ont fortement été conservés tout au long de l'évolution. Cependant, la taille et la composition des sous unités du ribosome diffèrent entre les organismes procaryotes et eucaryotes. Chez les procaryotes, le ribosome 70S est composé de l'association des sous unités 30S (ARNr 16S associé à 22 protéines ribosomiques (PR)) et 50S (ARNr 5S et 23S associés à 32 PR). En revanche, le ribosome des eucaryotes (80S), plus complexe et plus gros, est formé des sous unités 40S (ARNr 18S associé à 33 PR) et 60S (ARNr 5S, 5.8S et 25/28S associés à 49 PR) (Raue and Planta 1991; Woolford 1991).

La synthèse du ribosome nécessite l'action concertée de trois systèmes transcriptionnels (Figure 6) : les ARNr 18S, 5.8S et 28S (25S chez les plantes) sont transcrits par l'ARN Pol I, sous la forme d'un long précurseur polycistronique appelé pré-ARNr 45S. Les ARNr 5S sont transcrits par l'ARN Pol III et les gènes des PR sont transcrits par l'ARN Pol II. Une fois produits, les différents constituants sont associés en particules pré-ribosomiques dans le nucléole puis exportés vers le cytoplasme où ils seront assemblés pour former le ribosome mature lors de l'initiation de la traduction. La quantité de ribosomes produits



**Figure 6** : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

La plupart des étapes de la biogenèse des ribosomes se déroulent au sein du nucléole. Les gènes ribosomiques (ADNr 45S) codant les ARNr 18S, 5.8S et 25/28S sont transcrits par l'ARN Pol I puis maturés au sein du nucléole. En parallèle, les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par l'ARN Pol III dans le noyau puis importés dans le nucléole. Les gènes codant les protéines ribosomiques (PR) sont transcrits par l'ARN Pol II dans le noyau. Les ARNm sont exportés vers le cytoplasme où ils sont traduits en PR grâce aux ribosomes. Une partie de ces PR sont importées vers le nucléole où elles vont être assemblées avec les ARNr (18S, 5.8S, 25/28S et 5S) en particules pré-ribosomiques. Les autres PR s'associeront aux pré-ribosomes au moment de l'assemblage final.

dépend alors de l'efficacité des machines nucléolaires et du nombre de gènes ribosomiques actifs, eux même directement liés aux besoins cellulaires.

## **2- Le nucléole et le « métabolisme » des ARN**

Il a été montré qu'un grand nombre d'ARN transitent dans le nucléole avant d'être exportés vers le cytoplasme (Pederson and Politz 2000; Boisvert et al. 2007; Brown and Shaw 2008; Pederson 2011). Parmi ces derniers, des ARN transcrits par l'ARN Pol III, tels que les ARN de transfert (ARN-t), ont été identifiés (Bertrand et al. 1998; Pederson and Politz 2000) ce qui suggère un rôle du nucléole dans la biogenèse de certains de ces ARN. Chez les plantes, il semblerait que le nucléole soit également impliqué dans la synthèse des siARN (Short-Interfering ARN) (Li et al. 2006a; Pontes et al. 2006) ainsi que dans les processus d'épissage et de contrôle des ARNm (Pendle et al. 2005; Stark and Talianky 2009). De manière intéressante, 6 protéines appartenant au complexe d'épissage EJC ont été identifiées dans le nucléole par spectrométrie de masse (Pendle et al. 2005), ce qui renforce une implication potentielle du nucléole dans l'épissage des ARNm. Par exemple, la protéine eIF4A-III, est relocalisée vers le nucléole en réponse au stress hypoxique (Koroleva et al. 2009).

Le nucléole participe aussi à l'assemblage de différents complexes tels que les complexes SRP (Signal Recognition Particle), splicéosome ou encore télomérase (Boisvert et al. 2007). Par exemple, l'implication du nucléole dans l'assemblage du complexe SRP est à ce jour bien décrite. Le complexe SRP, composé d'ARN et de protéines, joue un rôle important dans l'ancrage des protéines sécrétrices au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE). Chez les mammifères, les ARN SRP ainsi que les protéines SRP transitent par le nucléole avant d'être exportés vers le cytoplasme (Jacobson and Pederson 1998; Politz et al. 2000; Politz et al. 2002). Le nucléole pourrait alors jouer un rôle dans la maturation des ARN SRP et/ou dans l'assemblage des particules SRP étant donné que ce dernier contient toute la machinerie nécessaire à la maturation et à l'assemblage des ribonucléoparticules.

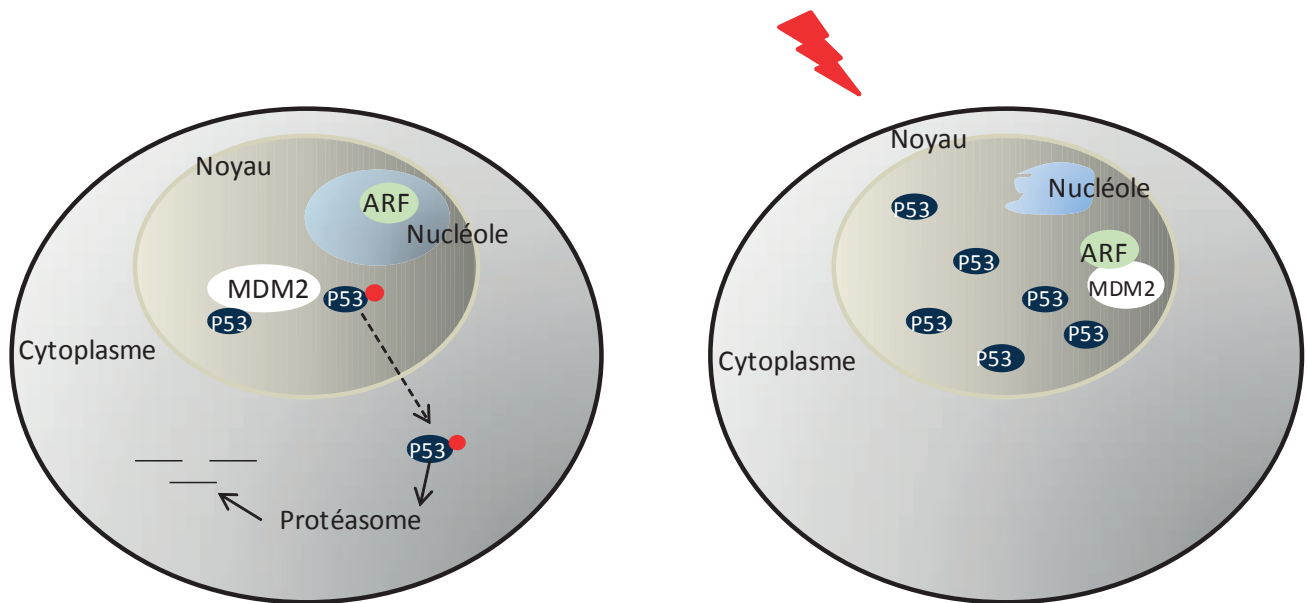
### 3- Le nucléole et la réponse au stress

Divers travaux ont révélé que la composition et la dynamique moléculaire du nucléole sont fortement affectées en conditions de stress (Boulon et al. 2010; Grummt 2013). Par exemple, la nucléoline, protéine majeure du nucléole, est relocalisée vers le nucléoplasme en réponse à différentes variations environnementales et/ou cellulaires (Daniely and Borowiec 2000; Daniely et al. 2002; Kim et al. 2005). La question se pose alors concernant le rôle que pourrait avoir le nucléole dans la réponse au stress.

Il apparaît que le nucléole est impliqué dans la séquestration de certaines protéines. Ce confinement apparaît comme un élément de contrôle des mécanismes cellulaires. La régulation du taux de protéine P53 par séquestration nucléolaire est un des exemples les plus connus (Figure 7). Dans des conditions normales, la protéine P53 est constitutivement exprimée mais rapidement dégradée par le protéasome suite à son ubiquitination par la protéine MDM2 (Mouse Double Minute 2), une E3 ubiquitine ligase. En conditions de stress, la protéine ARF (Alternative Reading Frame) est libérée du nucléole et relocalisée vers le nucléoplasme où elle interagit avec la protéine MDM2 et l'emprisonne. En conséquence, la protéine p53 est stabilisée dans le noyau et induit tout une cascade permettant l'arrêt du cycle cellulaire.

Cependant, d'autres facteurs sont également impliqués dans la régulation du taux de protéine p53 tels que les protéines ribosomiques RPL11 qui inhibent l'activité de MDM2 ou encore les protéines B23 et nucléoline qui contrôlent sa stabilité (Olson and Dundr 2005).

La séquestration de certaines de ces protéines est orchestrée par des longs ARN non codants, transcrits par l'ARN Pol I, à partir des séquences inter géniques des ADNr en condition de stress (Audas et al. 2012a). Par exemple, la chaleur induit la synthèse d'un ARN à 16Kb et 22Kb en aval du TIS (Transcription Initiation Site) alors que des variations de pH extracellulaire conduisent à l'accumulation d'ARN localisés 28Kb en aval du TIS (Audas et al. 2012a). Ces derniers vont cibler des protéines possédant une séquence de détention nucléolaire caractérisée par un motif arginine (R-R<sup>L</sup>/I) et deux triplets hydrophobes (L-X<sup>L</sup>/V) (Mekhail et al. 2007). Ces transcrits de 400 nucléotides immobilisent et séquestrent les protéines afin de les séparer de leur partenaire en réponse au stress. Parmi ces protéines se



**Figure 7 :** Représentation schématique de la régulation de la protéine P53 en réponse au stress

A gauche, le schéma représente une cellule dans les conditions normales de croissance. La protéine P53 est maintenue à un faible niveau dans la cellule suite à son ubiquitination (rouge) par la protéine MDM2 et sa dégradation dans le cytoplasme par le protéasome. La protéine ARF, qui régule l'activité de MDM2, est séquestrée dans le nucléole. A droite, en condition de stress, la structure du nucléole est affectée. La protéine ARF est alors relâchée du nucléole et migre dans le noyau où elle s'associe avec MDM2, affectant ainsi son activité. La protéine P53 n'est alors plus ubiquitinée et s'accumule dans le noyau.

trouvent par exemple, les protéines VHL (Von Hippel-Lindau), HSP70 (Heat Shock Protein 70), RNF8 (Ring Finger Protein 8), POLD1 (DNA Polymerase catalytic subunit  $\delta$ ) et DNMT1 (DNA méthyltransférase 1) (Audas et al. 2012b). Ces protéines sont alors distribuées au sein du centre de détention (DC), formé suite à la synthèse des longs ARN non codants (Jacob et al. 2013).

#### 4- Rôle du nucléole dans la senescence

Chez les eucaryotes, le mécanisme de réplication ne permet pas la synthèse des extrémités des chromosomes. En l'absence de mécanismes alternatifs, les chromosomes se raccourcissent à chaque génération ce qui peut conduire à la perte de gènes essentiels. Une des solutions mises en place dans la cellule, chez les eucaryotes, est d'ajouter des petites séquences répétées « TTAGGG » aux extrémités des chromosomes. Cette extension est catalysée par le complexe télomérase composé entre autre des enzymes ARN télomérase (hTR) et télomérase transcriptase réverse (hTERT). Au cours du cycle cellulaire, chez les mammifères, la hTR est localisée dans les corps de Cajal (Jady et al. 2004; Zhu et al. 2004) et la hTERT dans des petits foci subnucléaires (Tomlinson et al. 2006). Cependant, avant de commencer le processus d'élongation des télomères, les corps de Cajal contenant la hTR s'associent à la périphérie du nucléole et la hTERT transite par le nucléole. Ce trafic intranucléaire semble être important pour l'assemblage du complexe télomérase (Tomlinson et al. 2006).

Par ailleurs, depuis quelques années, il est admis que le raccourcissement des télomères induit un vieillissement cellulaire (Johnson et al. 1998). De nombreux travaux ont mis en évidence un lien entre le nucléole et le syndrome de Werner, affection provoquant un vieillissement prématuré (Marciniak et al. 1998; Szekely et al. 2000; von Kobbe and Bohr 2002). Chez la levure, il a été montré que les souches mutantes ayant une désorganisation du nucléole présentent un vieillissement accéléré (Sinclair et al. 1997) ce qui suggère que le nucléole joue un rôle dans le vieillissement cellulaire.

Chez *N. benthamiana*, l'expression transitoire de transcrits pleine taille du gène *AtTERT* d'*A. thaliana*, a permis de détecter cette protéine à la fois dans le noyau et le

nucléole et de déterminer que cette localisation est dépendante de plusieurs signaux NLS localisés tout au long de la protéine (Zachova et al. 2013).

## 5- Le nucléole et l'organisation nucléaire

Le nucléole est une structure dynamique et malléable lui permettant d'établir diverses relations avec le noyau. En fonction de leur activité, les gènes d'ARNr sont organisés et localisés différemment dans le nucléole (Pontvianne et al. 2013). Par exemple, chez *A. thaliana*, les gènes d'ARNr inactifs sont exclus du nucléole. Ainsi, lorsque le nombre de gènes d'ARNr actifs augmente, leur nombre diminue dans le nucléoplasme. Cependant, en plus des gènes d'ARNr, le nucléole contient de l'ADN nucléaire. En effet, il a été montré, chez la levure, que certaines régions génomiques interagissent avec les gènes d'ARNr (O'Sullivan et al. 2009). Cette interaction permet d'isoler dans le nucléole certaines régions nucléaires et de ce fait, de participer à l'organisation architecturale du génome. Par ailleurs, d'autres travaux basés sur du séquençage et des analyses de microarrays ont permis d'identifier, à partir de nucléoles purifiés, des domaines de chromatine associés au nucléole (NAD, Nucleolus Associated Domains) (Nemeth et al. 2010; van Koningsbruggen et al. 2010). Ces NADs contiennent des gènes impliqués dans des processus cellulaires particuliers comme le développement ou encore la réponse au stress biotique. Par exemple, chez les mammifères, certaines régions génomiques composées de gènes transcrits par l'ARN Pol II s'associent avec le nucléole (Nemeth and Langst 2011). Il est alors possible d'envisager que le nucléole puisse intervenir dans la régulation de l'expression des gènes autres que les ADNr. D'autre part, certaines séquences génomiques associées aux NADs ont également été observées au sein des LADs (Lamina Associated Domains), identifiés par cartographie à haute résolution. Les LADs représentent un environnement chromatinien non favorable à la transcription (Guelen et al. 2008; van Koningsbruggen et al. 2010). Ainsi, la présence de séquences communes d'ADN entre les LADs et les NADs suggère que les NADs sont aussi importants que les LADs dans l'organisation nucléaire. Ainsi, le nucléole représente un excellent modèle d'étude pour l'organisation du génome. De manière intéressante, très récemment, au sein de l'équipe, des travaux préliminaires ont permis de mettre en évidence que certaines régions génomiques sont aussi séquestrées dans le nucléole chez *A. thaliana* (résultats non publiés) ce qui renforce l'idée que le nucléole participe à l'organisation nucléaire du génome.

## **6- Rôle du nucléole dans l'infection virale et les maladies**

De nombreux travaux ont révélé la présence de plusieurs protéines virales dans le nucléole suggérant alors un potentiel rôle de ce dernier dans la régulation du cycle viral (Hiscox 2002). Plusieurs études ont en effet montré que les virus utilisent le nucléole pour assurer le transport de leur ARNm et de l'ensemble des facteurs nucléolaires nécessaires à leur réplication ou assemblage (Salveti and Greco 2014). Par exemple, la protéine WNV (West Nile Virus), en interagissant avec l'hélicase nucléolaire DDX56, est relocalisée vers le cytoplasme où elle intervient dans l'assemblage des particules du virus (Xu et al. 2011; Xu and Hobman 2012). Par ailleurs, il a également été montré que les interactions protéines virales/nucléole bloquent l'apoptose ce qui permet au virus de se répliquer (Salveti and Greco 2014).

Il semble aussi exister une relation entre le nucléole et les maladies humaines. Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence un lien entre le nucléole, les troubles neurodégénératifs et le cancer. En effet, il semblerait que la dérégulation de l'expression des ADNr et par conséquent, l'altération de la structure du nucléole soit associée à divers syndromes tels que les maladies de Huntington et Parkinson ou encore le cancer (Quin et al. 2013; Lee et al. 2014; Parlato and Liss 2014).

Chez les plantes, il existe aussi des virus dont une partie de leur cycle viral est localisée dans le nucléole. De nombreuses études ont montré le rôle du nucléole dans la réplication et le transport du virus ainsi que dans la formation des particules virales (Taliensky et al. 2010). C'est le cas par exemple des virus de la famille des Umbravirus tels que les espèces virales GRV (Groundnut Rosette Virus), TMoV (Tobacco Mottle Virus) ou encore CMoV (Carrot Mottle Virus). Le génome de ces virus code pour 4 protéines appelées ORF (Open Reading Frame) dont la troisième (ORF3) est majoritairement localisée dans le nucléole (Ryabov et al. 1998; Ryabov et al. 2004). Cette dernière interagit avec la fibrillarine ce qui lui permet d'enclencher le processus d'encapsidation et de réorganiser le complexe viral néo formé en structure hélicoïdale (Taliensky et al. 2010).

Ainsi, l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette dernière décennie ont permis de mettre à jour la plurifonctionnalité du nucléole. Désormais, le nucléole n'est plus



considéré comme l'unique lieu de la biogenèse des ribosomes mais comme un acteur central intervenant dans de nombreux mécanismes cellulaires.

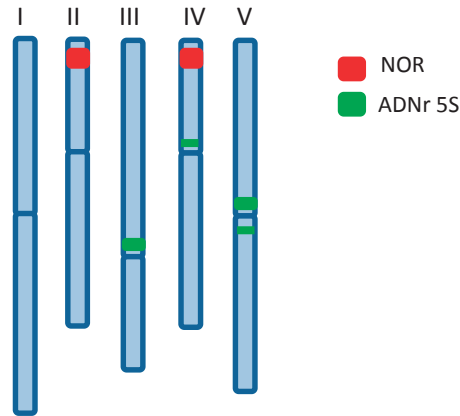
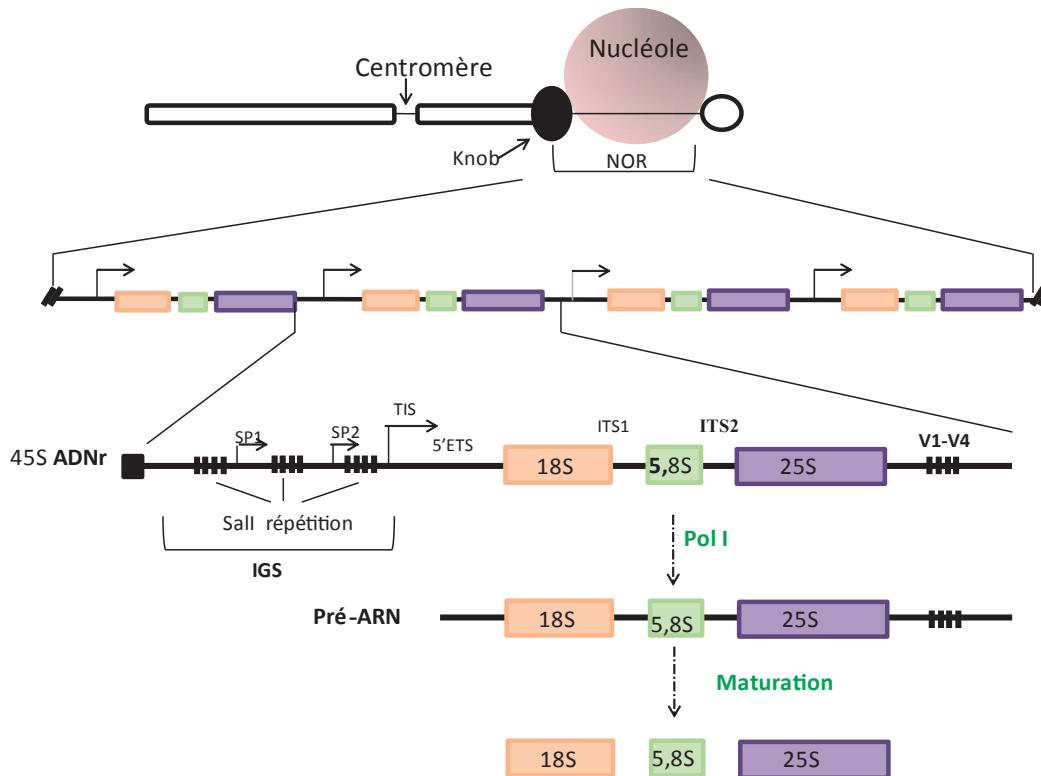
## II- Les gènes d'ARN ribosomiques

### A- Organisation des gènes ribosomiques (ADNr)

#### 1- Les gènes ribosomiques

Chez les eucaryotes, les gènes ribosomiques 45S (ADNr 45S) codants les ARNr 18S, 5.8S et 25/28S sont présents en un grand nombre de copies dans la cellule : par exemple, entre 150 et 200 copies de gènes ont été identifiés chez la levure, environ 400 copies chez l'homme et près de mille copies chez certaines espèces végétales (Raska et al. 2004; Stepinski 2014). Ces gènes, fortement répétés, sont organisés en tandem et regroupés en cluster sur différentes régions chromosomiques appelées NORs. Chez l'homme, près de 200 copies par génome haploïde sont réparties sur cinq chromosomes : XIII, XIV, XV, XXI et XXII (Raska et al. 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, environ 700 copies par génome haploïde sont réparties à l'extrémité des bras courts des chromosomes II et IV et sont orientées dans la même direction (Figure 8A et (Pikaard 2002)). Chez d'autres espèces végétales, le nombre de gènes peut être beaucoup plus important, comme par exemple chez *Allium cepa* (oignon) où environ 7000 copies d'ADNr sont dénombrées par génome haploïde (Stepinski 2014).

Chaque unité génique 45S est composée d'une séquence codant un long précurseur polycistronique contenant les ARNr 18S, 5.8S et 25/28S séparés entre eux par des espaceurs internes (ITS1 et ITS2) et encadrés aux extrémités par des espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) (Figure 8B et (Pikaard 2002; Grummt 2003)). Les gènes sont transcrits par l'ARN Pol I en précurseurs ARNr qui sont maturés suite aux clivages des éléments 5'ETS, 3'ETS, ITS1 et ITS2 et à des modifications chimiques. Les trois ARNr matures 18S, 5.8S et 25/28S sont les clefs de voûte des ribosomes : associés aux protéines ribosomiques, l'ARNr 18S forme la petite sous unité du ribosome alors que les ARNr 5.8S et 25/28S constituent la grande sous unité. Les unités géniques d'ADNr sont séparées les unes des autres par des séquences inter géniques (IGS) contenant le promoteur, des séquences répétées, des promoteurs espaceurs

**A****B**

**Figure 8** : Organisation des gènes ribosomiques 45S chez *Arabidopsis thaliana*

**A** : Représentation schématique des cinq chromosomes d'*A. thaliana*. Les gènes d'ARNr 45S contenus dans les NORs (blocs rouges) sont localisés à la périphérie des chromosomes II et IV et les gènes d'ARNr 5S (blocs verts) sont situés au niveau des régions péri-centromériques des chromosomes III, IV et V. **B** : Représentation schématique d'un NOR (adaptée de Pikaard CS, 2002) : Une partie du NOR est structurée en « Knob » (chromatine condensée) alors que l'autre partie est composée de gènes ribosomiques transcrits (chromatine ouverte) donnant naissance au nucléole. A l'intérieur du NOR, les ADNr, présents en un grand nombre de copies, sont organisés en tandem. Les unités sont séparées les unes des autres par des séquences inter géniques (IGS) contenant les promoteurs espaceurs (SP1 et SP2), les éléments répétés Sall et le promoteur contenant le site d'initiation de la transcription (TIS). L'ARN Pol I transcrit un poly cistron contenant les espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et les trois ARNr 18S, 5.8S et 25S séparés entre eux par les espaceurs internes (ITS1 et ITS2). Les ARNr matures sont obtenus suite à différentes étapes de clivages et de modifications. Dans la région 3'ETS sont représentés les 4 éléments répétés appelés variants (V1-V4).

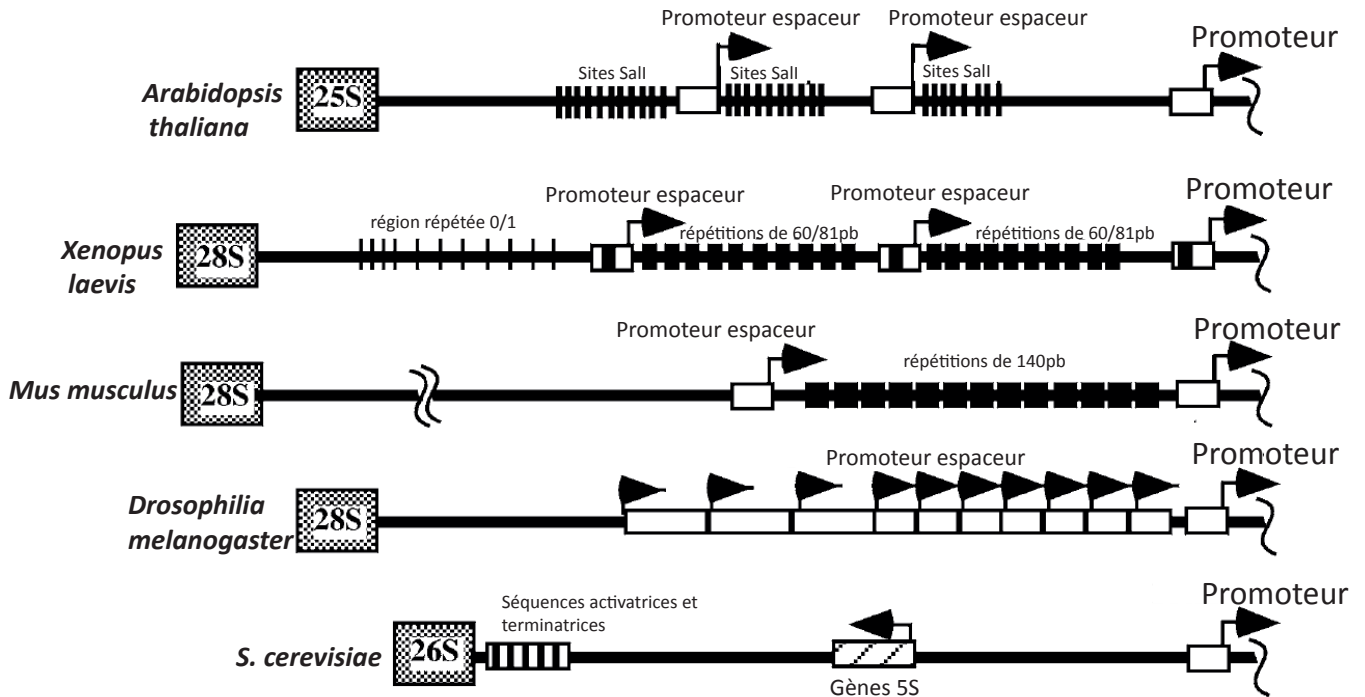
et des séquences de liaison aux facteurs de terminaison de la transcription (Figure 9 et (Saez-Vasquez and Echeverria 2006; McStay and Grummt 2008)).

Les gènes ribosomiques 5S sont, eux aussi, des gènes fortement répétés. Leur nombre peut aller de quelques dizaines chez *E. coli* à quelques centaines chez l'homme et plusieurs milliers chez les plantes (Schneeberger et al. 1989; Sorensen and Frederiksen 1991; Campell et al. 1992; Condon et al. 1995). Chez *A. thaliana*, environ 1000 copies par génome haploïde sont dénombrées. A la différence des gènes 45S, les gènes 5S sont transcrits par l'ARN Pol III et regroupés dans les régions péri-centromériques des chromosomes III, IV et V (Figure 8A et (Campell et al. 1992)). Les gènes 5S sont donc physiquement séparés des gènes 45S. Cependant, cette organisation en différents cluster est principalement retrouvée chez les plantes à graines. En effet, chez certaines espèces végétales, notamment les streptophytes et bryophytes, l'ensemble des ADNr (45S et 5S) sont regroupés au sein d'un même cluster (Wicke et al. 2011). De même, chez la levure *S. cerevisiae*, les gènes 35S et 5S sont associés sur la même unité génique du chromosome XII mais en sens inverse (Drouin and de Sa 1995).

## 2- Organisation des ADNr 45S

Généralement, les séquences codant les ARNr sont hautement conservées entre les différentes espèces, même les plus éloignées. Cependant, il arrive parfois que ces séquences varient ; c'est le cas par exemple chez *A. thaliana* où une délétion de 270pb a été caractérisée dans une région codant l'ARNr 18S, responsable de la formation d'une hélice importante pour la fonction du ribosome (Mentewab et al. 2011). A ce jour, aucune évidence ne permet de dire si cet ARN tronqué est utilisé pour produire des ribosomes. Néanmoins, il est alors fortement probable que ce dernier devienne un pseudo gène qui sera éliminé au cours de l'évolution.

En revanche, une variabilité considérable est observée dans les régions inter géniques (Raska et al. 2004; Stepinski 2014). Chez les animaux, les IGS sont plus bien grandes que chez les plantes. Par exemple, chez l'homme, une IGS représente environ 14Kb contre ~5Kb chez *A. thaliana* (Sylvester et al. 2004; Stepinski 2014). De fortes diversités de séquence sont également observées entre différentes espèces de plantes telles que le radis



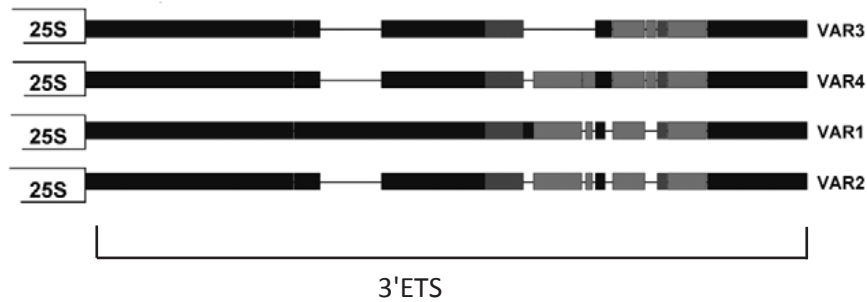
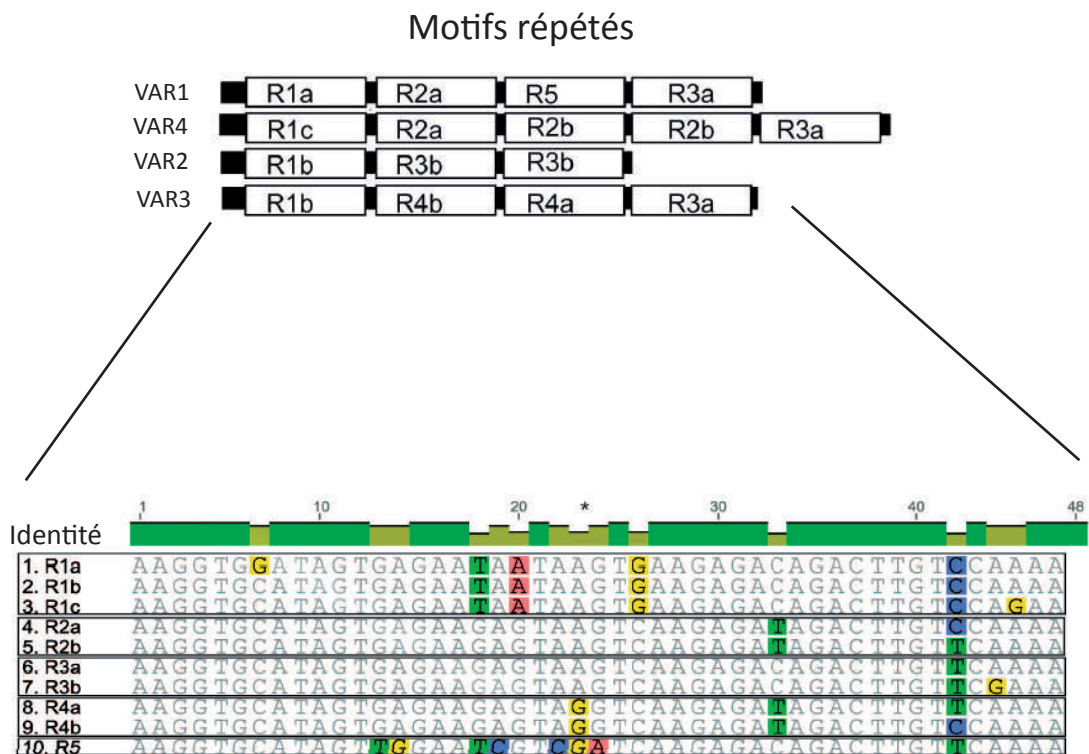
**Figure 9 :** Comparaison des IGS des gènes d'ARNr de différents organismes eucaryotes (Pikaard, 2002)

Les IGS des eucaryotes supérieurs (*Xenopus laevis*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* et *Mus musculus*) sont généralement composés de promoteurs espaceurs séparés les uns des autres par des séquences répétées sauf chez la drosophile. Ces éléments répétés ne présentent aucune similarité de séquence bien que chacune possède la capacité d'activer la transcription lorsqu'elles sont fusionnées au promoteur des gènes d'ARNr de *X. laevis* (Doelling and Pikaard, 1993; Pikaard et al., 1990). En revanche, l'organisation des IGS chez la levure est quelque peu différente. Aucune séquence répétée n'a été identifiée et un exemplaire du gène 5S transcrit par l'ARN Pol III est localisé en orientation inverse des gènes 35S transcrits par l'ARN Pol I.

*Raphanus sativus* (Delseny et al. 1979; Delcasso-Tremousaygue et al. 1988), *Arabidopsis thaliana* (Gruendler et al. 1991), le riz *Oryza sativa* (Cordesse et al. 1993) ou encore les genres *Brassica* (Tremousaygue et al. 1992) et *Nicotiana* (Borisjuk et al. 1997). Cette hétérogénéité est aussi retrouvée au sein d'une même espèce, avec par exemple, près de 60% de différence en séquence nucléotidique entre les espèces *Vicia faba*, *V. angustifolia* et *V. hirsuta* (Fèves) (Kato et al. 1990; Ueki et al. 1992; Yakura and Nishikawa 1992). Les IGS encadrent les séquences codants les ARNr relativement bien conservés. Ainsi, cette forte variabilité des IGS peut s'expliquer par le phénomène de la co-évolution moléculaire proposant que les séquences fonctionnelles et importantes pour l'organisme évoluent moins rapidement que les autres séquences (Dover and Flavell 1984).

De façon très intéressante, chez *A. thaliana*, d'importantes variations de séquences ont été identifiées dans la région 3'ETS. Ces dernières permettent de distinguer quatre formes de gènes d'ARNr appelées variants 1, 2, 3 et 4 (Figure 10A et (Pontvianne et al. 2010; Abou-Ellail et al. 2011)). Ce polymorphisme est localisé en aval de la séquence codant le site de coupure de la protéine RTL2, une RNase III impliquée dans la maturation de l'extrémité 3'ETS des ARNr (Comella et al. 2008). Ces différentes formes se distinguent les unes des autres d'une part, par la présence d'insertions d'environ 80pb (*VAR1*) ou de délétions d'environ 90pb (*VAR3*) additionnées ou non de plus petites insertions et délétions (*VAR2* et *VAR4*) et d'autre part, d'un motif de 47pb dont la répétition varie en fonction des différents variants (Figure 10B et (Abou-Ellail et al. 2011)). De manière intéressante, la représentation de chacun de ces variants au sein du génome est assez hétérogène. Le variant 1, le plus polymorphique, représente à lui seul près de la moitié de l'ensemble des copies d'ADNr (~50%) alors que les variants 2 et 3 représentent 30% et 20% des copies et le variant 4 seulement 1% (Pontvianne et al. 2010). Curieusement, le *VAR1*, fortement représenté, n'est naturellement pas exprimé dans les différents tissus de la plante, excepté dans les graines en cours de germination, alors qu'à l'inverse, les autres variants sont transcriptionnellement actifs (Pontvianne et al. 2010). Ainsi, la question se pose concernant l'importance de ces séquences et de leur expression au sein du génome d'*A. thaliana*.

Cette variation nucléotidique est également retrouvée au sein des différents écotypes d'*A. thaliana*. Toutefois, certains d'entre eux ne semblent posséder que deux

**A****B**

**Figure 10 :** Polymorphisme de la région 3'ETS des gènes d'ARNr chez *A. thaliana*

**A :** Représentation schématique des 4 variants dans la région 3'ETS (Pontvianne et al., 2010). Les rectangles schématisent la conservation des séquences (de la plus conservée (noir) à la moins conservée (gris clair)). Les lignes joignant les rectangles représentent les délétions de séquences. **B :** Organisation structurale de la région 3'ETS (adaptée de (Abou-Ellail et al., 2011)). En haut est représenté le motif de 47pb répété plusieurs fois en fonction des différents variants. Ces répétitions présentent des polymorphismes au sein de leur séquence permettant de générer 5 types de motifs nommés R1, R2, R3, R4 et R5 dont l'organisation permet de distinguer les 4 variants entre eux. En bas, un alignement des séquences répétées est présenté avec les mutations nucléotidiques.

(*Landsberg erecta* et *Wassilewskija*) voire un seul (*C24* et *Shahdara*) type de variant ce qui souligne la rapidité à laquelle l'organisation de ces séquences évoluent (Abou-Elail et al. 2011). En revanche, pour le moment aucun polymorphisme dans cette région n'a été reporté chez les animaux. Néanmoins, des variations localisées dans le promoteur des gènes d'ARNr ont été identifiées chez la souris. Ces dernières permettent de distinguer cette fois-ci 7 formes variantes qui sont exprimées et régulées, elles aussi, de façon différentielle (Tseng et al. 2008; Ihara et al. 2011).

### 3- Importance des ADNr dans la stabilité du génome

Au départ, chez les animaux comme chez les plantes, la présence d'un nombre important de gènes ribosomiques a été perçue comme un réservoir pour la production d'ARNr. Cependant, depuis quelques années, divers travaux ont montré que le nombre de copie de gènes ribosomiques constitue un facteur très important pour la stabilité et l'intégrité du génome (Ide et al., 2010; Kobayashi, 2011; Paredes and Maggert, 2009). En effet, en raison de leur forte nature répétée, les ADNr sont très sensibles aux mécanismes de recombinaison homologue, qui conduisent à un gain ou une perte du nombre de copie, responsable d'instabilité génomique globale (Guettg et al., 2010; Kobayashi, 2011). Par exemple, chez les mammifères, une perte de 20% des copies d'ADNr est induite suite à des mécanismes de recombinaison homologue survenus après inhibition par ARN interférence de la protéine TIP5, membre du complexe NoRC (Nucleolar Remodeling Complex) impliqué dans la répression des ADNr (Guettg et al., 2010). Chez la drosophile, la délétion des gènes d'ARNr sur le chromosome Y induit une diminution de la formation de l'hétérochromatine nécessaire pour réprimer l'expression des gènes à l'échelle globale du génome. De même, les mutants de gènes impliqués dans la formation de l'hétérochromatine, tels que *su(var)3-9* et *su(var)2-1*, présentent, eux aussi, un nombre réduit d'ADNr ce qui suggère que ces gènes contribuent à une balance entre l'hétérochromatine et l'euchromatine (Paredes and Maggert 2009).

Afin de pallier à ce problème, les gènes d'ARNr ont leur propre système d'amplification. Pendant la phase S du cycle cellulaire, le processus de réplication est inhibé par la protéine FOB1 (Fork Blocking protein) et des Cassures Double Brin d'ADN (DSB) sont générées. Ces cassures sont, par la suite, réparées par recombinaison avec la chromatide

sœur ce qui permet d'augmenter le nombre de copies d'ADNr (Kobayashi et al. 1998; Kobayashi 2003; Kobayashi and Ganley 2005). Chez la levure, il a été montré que les copies inactives des gènes constituent une plateforme d'assemblage pour les complexes de cohésine, impliqués dans l'association et la cohésion des chromatides sœurs, assurant alors la stabilité génomique des locus ADNr (Ide et al. 2010). De manière intéressante, les souches de levures ayant un nombre différent de gènes ribosomiques présentent le même taux de transcription (French et al. 2003). Cependant, les souches de levures possédant un nombre de gènes ribosomiques réduit sont plus sensibles aux dommages de l'ADN étant donné que l'ensemble des copies sont actives transcriptionnellement. Cette sensibilité est dépendante de l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol I puisque la transcription induit une séparation prématurée des chromatides sœurs empêchant alors leur recombinaison et donc la réparation (Ide et al., 2010).

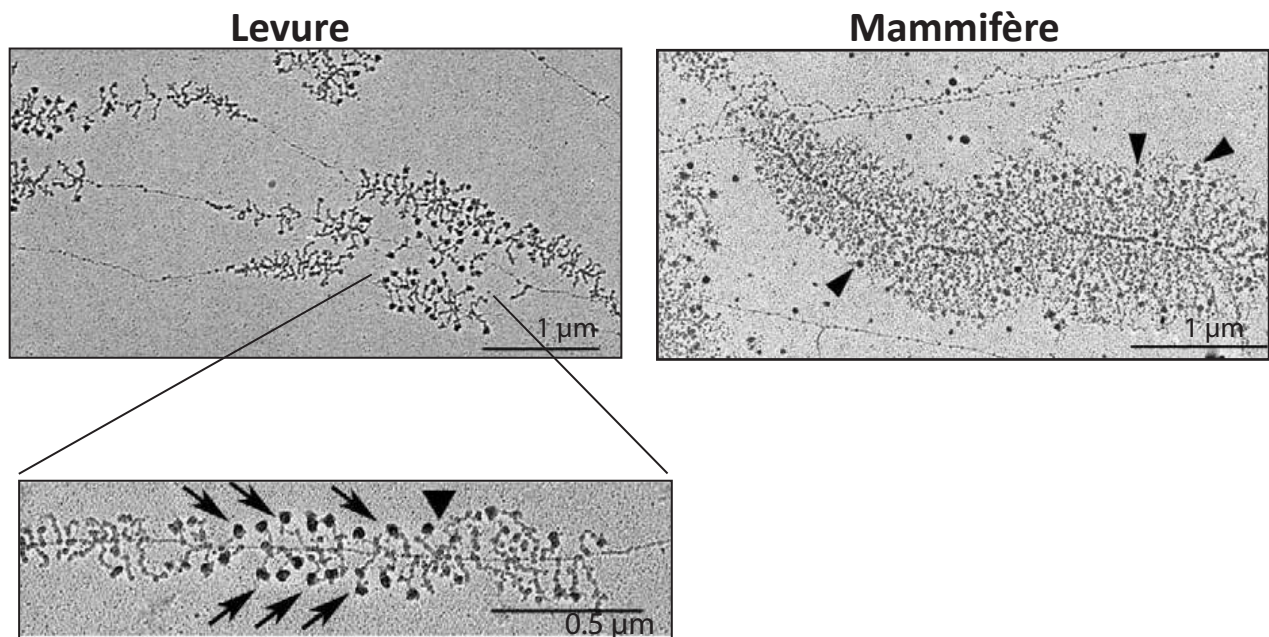
L'instabilité des ADNr a également un impact sur la répartition de certains facteurs et l'organisation de la chromatine dans d'autres régions génomiques (Kobayashi, 2011). Par exemple, chez la levure, les gènes d'ARNr sont réprimés suite à l'action synergique des protéines SIR2, Net1 et CDC14 (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999). Cependant, l'histone deacétylase SIR2, en collaboration avec les protéines SIR3 et SIR4, est également impliquée dans la répression des télomères (Strahl-Bolsinger et al., 1997). La diminution du nombre de copie d'ADNr conduit au relâchement de la protéine SIR2 du nucléole et par conséquent, à l'augmentation de la répression des séquences télomériques (Michel et al., 2005).

## **B- Transcription des gènes ribosomiques 45S**

### **1- Deux types de gènes ribosomiques : des gènes actifs et des gènes inactifs**

Les gènes d'ARNr actifs ont été visualisés par Miller et Beatty suite à l'utilisation de la technique de l'étalement de la chromatine sur des oocytes de Xénope. Cette approche permettant de visualiser, au microscope électronique, les gènes ribosomiques en cours de transcription a permis de révéler la formation de structures en arbre de Noël appelées « Christmas trees » (Figure 11 et (Miller and Beatty 1969)). Dans cette structure, le tronc de





**Figure 11** : Transcription par l'ARN Pol I : formation de structures en « arbres de Noël »

Photographies au microscope électronique des gènes d'ARNr en cours de transcription après étalement de la chromatine sur des nucléoles de levures et de souris (Raska et al., 2006). Chez la levure, différents niveaux de charge en ARN Pol I sont observés pour les gènes transcrits. Un agrandissement de l'image montre la présence des complexes de maturation (indiqués par les flèches) à l'extrémité des branches correspondant aux ARNr en cours de transcription. Chez la souris, seuls les ADNr actifs sont visualisés. Le niveau de charge en ARN Pol I est au maximum et les complexes de maturation (indiqués par les flèches) sont également associés à l'extrémité des transcrits.

chaque arbre représente l'ADNr, les branches désignent les pré-ARNr en cours de transcription (environ une centaine par branche) et les petites boules localisées à l'extrémité de chaque branche correspondent aux complexes de maturation et d'assemblage. Ces structures typiques de la transcription par l'ARN Pol I ont été observées plus tard chez la levure, les mammifères et les plantes (Harper and Puvion-Dutilleul 1979; Shaw et al. 2002; Raska et al. 2004). En parallèle, l'identification du complexe U3 snoRNP, à l'extrémité des branches, a permis de mettre en évidence un couplage transcription/maturation chez la levure, les animaux ou encore les protistes (*Dictyostelium*) (Grainger and Maizels 1980; Mougey et al. 1993; Dragon et al. 2002). Ceci a été observé un peu plus tard chez les plantes où le complexe de maturation U3 snoRNP, associé aux ADNr, semble coordonner les processus de transcription et de maturation des ARNr (Saez-Vasquez et al. 2004b). Le succès de cette technique a permis de distinguer deux catégories de gènes d'ARNr : des gènes transcrits formant les « arbres de Noël » et des gènes non transcrits. Ceci a mené à l'élaboration d'un modèle binaire suggérant que des clusters de gènes sont soit actifs « ON » ou soit inactifs « OFF » (Reeder 1999; Grummt 2003).

## 2- Transcription par l'ARN Pol I et les facteurs de transcription

### a- Promoteur des gènes d'ARNr

Chez les mammifères, le promoteur des ADNr 45S est composé de deux domaines : le domaine CPE (Core Promoter Element) et le domaine UCE (Upstream Control Element), homologue de l'élément UPE (Upstream Promoter Element) chez la levure (Raska et al. 2004). L'élément CPE, contenant le TIS, est généralement suffisant pour initier la transcription par l'ARN Pol I (Paule and White 2000). L'élément UCE, localisé en amont du CPE (environ -156/-107pb du TIS), quant à lui, joue un rôle important dans la stimulation de la transcription puisqu'il permet la stabilisation des facteurs de transcription sur l'élément CPE (Paule and White 2000). Bien que cette structure bipartite soit relativement bien conservée chez la levure et les mammifères, il y a très peu de similarité de séquences entre les différents éléments ; en conséquence, la transcription par l'ARN Pol I est espèce-spécifique (Goodfellow and Zomerdijk 2013).

Chez les plantes, la majorité des données concernant les éléments *cis* proviennent des travaux réalisés sur les séquences IGS chez *A. thaliana*. Le promoteur proximal a été identifié entre -55 et + 6 du TIS sachant que les séquences localisées entre -33 et +6 sont suffisantes pour initier une activité transcriptionnelle (Doelling et al. 1993; Doelling and Pikaard 1995; Saez-Vasquez and Pikaard 2000). Par ailleurs, la taille et l'organisation des IGS des plantes sont très similaires à celles observées chez *X. laevis* (Figure 9 et (Pikaard 2002)). En effet, chez ces deux espèces, en plus du promoteur proximal, les IGS sont composées de promoteurs espaceurs ainsi que de séquences répétées qui sembleraient avoir une activité enhancer chez *X. laevis* (Pikaard 1994). Chez *A. thaliana*, ces séquences répétées, localisées entre les deux promoteurs espaceurs, comportent de nombreux sites de restriction Sall. Cependant, ces derniers ne semblent pas affecter l'activité transcriptionnelle du promoteur puisque leur délétion ne modifie pas l'activité d'initiation de la transcription (Doelling et al. 1993; Wanzenbock et al. 1997). Le rôle de ces séquences dans la transcription reste encore à définir bien que certains travaux leur attribuent une fonction dans la régulation de la transcription *via* des modifications structurales de la chromatine (Lawrence et al. 2004; Mayer et al. 2006b; Pontes et al. 2006; Preuss et al. 2008).

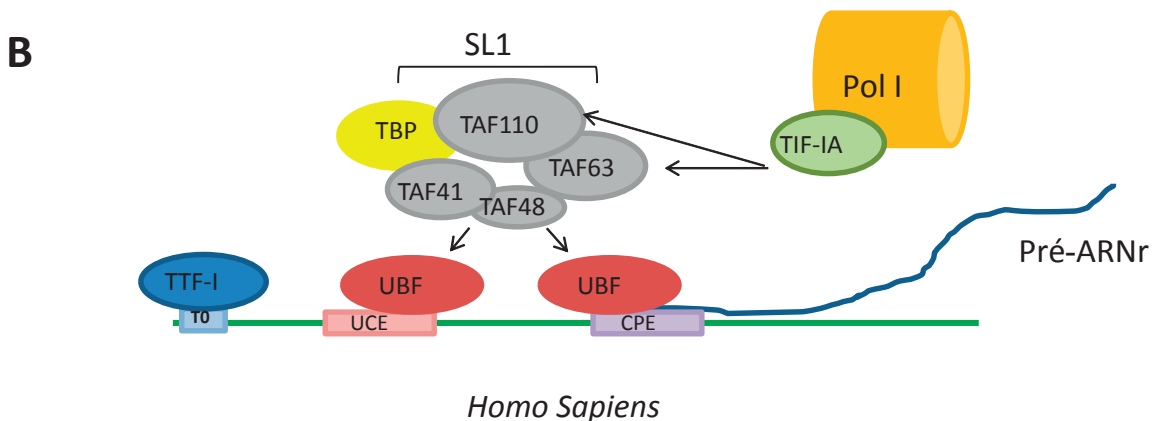
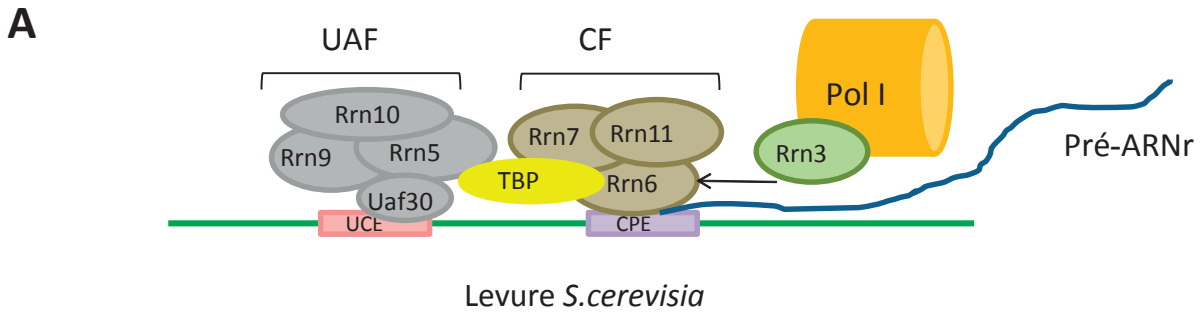
#### b- Facteurs de transcription et ARN Pol I

Généralement, les modèles traditionnels s'accordent à dire que l'initiation de la transcription repose sur plusieurs étapes dont la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC), c'est-à-dire l'assemblage des facteurs de transcription et de l'ARN Pol I directement sur le promoteur. Cependant, plusieurs travaux tendent à réfuter ce concept et prônent l'existence d'un complexe ARN Pol I multi-protéique, appelé « holoenzyme », dans lequel les facteurs de transcription et les co-activateurs sont déjà assemblés avec l'ARN Pol I avant de se fixer sur le promoteur du gène. L'existence de ce complexe a été mise en évidence pour la première fois chez *B. oleracea* (Saez-Vasquez and Pikaard 1997). Cette holoenzyme de 2MDa est composée d'environ 30 polypeptides. Parmi ces derniers, outre l'ARN Pol I, les protéines caséine-kinase 2 (CK2-like) (Saez-Vasquez et al. 2001) et une histone acétyltransférase (Saez-Vasquez and Echeverria 2006) ont été identifiées, tout comme chez *X. laevis* (Albert et al. 1999). Ce complexe multi-protéique interagit de façon spécifique avec la région promotrice localisée entre -30 et +20 (Saez-Vasquez and Pikaard

2000) ce qui est en accord avec les données publiées par (Doelling et al. 1993). Par la suite, la purification de l'ARN Pol I a été réalisée chez d'autres organismes tels que le Xénope (Albert et al. 1999), le rat (Hannan et al. 1999) ou encore la souris (Seither et al. 1998), ce qui renforce l'hypothèse d'une organisation du complexe transcriptionnel en holoenzyme même si d'autres approches réalisées *in vivo* considèrent plutôt que l'ARN Pol I s'assemble sur les ADNr et ce, à chaque cycle de transcription (Dundr et al. 2002).

La première étape de la transcription consiste en la formation du PIC sur le promoteur des gènes d'ARNr (Figure 12). Chez la levure, deux facteurs sont impliqués dans ce processus : UAF (Upstream Activating Factor) associé à la TBP (TATA Binding Protein) qui se lie à l'élément UCE, et CF (Core Factor) qui se lie à l'élément CPE (Moss 2004). Chez les mammifères, la formation du PIC requiert l'intervention synergique de plusieurs protéines : UBF, TIF-1A (Transcriptional Initiation Factor IA) et SL1/TIF-1B (composé de la TBP et de ses 4 facteurs associés TAFs (Transcription Associated Factor)) (Learned et al. 1986). La protéine UBF joue un rôle décisif dans la formation du PIC. En effet, grâce à ses motifs HMG (High Mobility Group), UBF se lie sur le promoteur des gènes et induit la formation d'une boucle d'ADN permettant de rapprocher les domaines UCE et CPE qui constituent la plateforme d'assemblage pour le PIC (Bazett-Jones et al. 1994; Copenhaver et al. 1994). La protéine SL1, elle, confère la spécificité d'interaction de l'ARN Pol I sur le promoteur du gène (Zomerdijk et al. 1994; Heix et al. 1997). Le facteur TIF-IA (homologue de Rrn3 chez la levure), interagit avec l'ARN Pol I et deux protéines TAFs. Cette association permet de connecter la polymérase au PIC et de ce fait d'initier la transcription (Miller et al. 2001; Yuan et al. 2002). Le facteur TTF-I (homologue de Reb1p chez la levure), est également nécessaire pour déclencher la transcription. En se fixant sur le site T0 du promoteur proximal, TTF-I recrute des facteurs de remodelage qui vont permettre le positionnement du nucléosome sur la molécule d'ADN dans un contexte favorable à la transcription (Langst et al. 1997).

En plus d'initier la transcription, certains de ces facteurs sont également impliqués dans l'organisation chromatinienne des ADNr. Par exemple, la protéine UBF participe au maintien d'une structure permissive à la transcription suite au déplacement de l'histone H1 (Kermekchiev et al. 1997; Sanij et al. 2008). UBF interagit également avec le facteur de régulation CTCF, impliqué dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARN (van de Nobelen et al. 2010; Guerrero and Maggert 2011). Le complexe SL1, semblerait, quant à lui,



**Figure 12:** Initiation de la transcription par l'ARN Pol I

Schéma représentant le recrutement de l'ARN Pol I au niveau des promoteurs des ADNr.

**A :** Chez la levure, le complexe de pré-initiation de la transcription se forme suite à l'interaction des complexes UAF et CF avec la TBP sur les régions promotrices des ADNr. L'ARN Pol I est recrutée par la protéine Rrn3 suite à son association avec le PIC. **B :** Chez l'homme, l'initiation de la transcription est le résultat de l'assemblage du complexe SL1 et de la protéine UBF sur le promoteur des ADNr. Le complexe SL1 se fixe sur les séquences promotrices des gènes d'ARNr. La protéine UBF joue le rôle de stimulateur de la transcription. L'ARN Pol I est recrutée suite à l'interaction du facteur TIF-IA avec le complexe SL1. Le facteur de terminaison TTF-I participe au positionnement des nucléosomes sur les séquences promotrices et favorise la formation d'une structure chromatiniennne permissive à la transcription (Goodfellow and Zomerdijk, 2013).

participer à l'organisation structurale des gènes transcriptionnellement actifs grâce à son interaction avec les séquences promotrices et activatrices et son implication dans la maintenance de l'hypométhylation du promoteur des ADNr (Goodfellow and Zomerdijk 2013).

En revanche, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles concernant l'identification des facteurs de transcription impliqués dans la transcription ARN Pol I chez les plantes. Aucun homologue de la protéine UBF n'a été identifié. Néanmoins, le séquençage du génome d'*A. thaliana* (programmes AGI 2000) et d'autres espèces (IRGSP 2005) a permis de révéler l'existence de potentiels facteurs de transcription similaires à ceux identifiés chez les mammifères ou la levure. Chez *A. thaliana*, une protéine similaire à UBF possédant plusieurs groupes HMG a été identifiée et deux séquences similaires aux facteurs TIF-IA/Rrn3 ont été caractérisées (données non publiées).

## C- Mécanismes de régulation de la transcription

De nombreux travaux ont été réalisés concernant les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes d'ARNr. A l'heure actuelle, deux stratégies de régulation ont été mises en évidence: la transcription est contrôlée soit par des changements du taux de transcription des gènes déjà actifs ou bien par un ajustement du nombre de copies potentiellement actives (McStay and Grummt 2008).

### 1- Régulation du taux de transcription

Chez tous les eucaryotes, l'ensemble des conditions cellulaires et/ou environnantes influent sur la synthèse des ARNr. Généralement, ce sont les facteurs de croissance ou les hormones qui vont définir le taux de transcription ARN Pol I des gènes ribosomiques.

Chez les vertébrés, l'activité de l'ARN Pol I joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription (Moss 2004; Stefanovsky and Moss 2006). Le taux de transcription est contrôlé par de nombreux facteurs qui vont stimuler ou réprimer l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol I (Table 1 et (Grummt 2003; Moss 2004; Russell and Zomerdijk 2005; Goodfellow and Zomerdijk 2013)). La plupart de ces protéines sont les cibles de différentes voies de régulation intervenant dans la réponse au stress ainsi que dans la croissance

|                               | <b>Facteurs de régulation</b>  | <b>Cibles de la transcription<br/>ARN Pol I</b> | <b>Références</b>  |   |
|-------------------------------|--------------------------------|---|--|---|
| Activateurs                   | <b>G1-specific cyclin/CDKs</b> | UBF   | (Voit et al., 1999)  |   |
|                               | <b>ERK</b>                     | Rrn3, UBF                                       | (Stefanovsky et al., 2001; Zhao et al., 2003)                    |   |
|                               | <b>CK2</b>                     | UBF, Rrn3                                       | (Bierhoff et al., 2008; Lin et al., 2006)                        |   |
|                               | <b>mTOR</b>                    | Rrn3, UBF                                       | (Claypool et al., 2004; Hannan et al., 2003; Mayer et al., 2004) |   |
|                               | <b>CBP</b>                     | UBF   | (Pelletier et al., 2000)   |   |
|                               | <b>TIP60</b>                   | UBF   | (Halkidou et al., 2004)  |   |
|                               | <b>Cmyc</b>                    | SL1   | (Grandori et al., 2005)  |   |
|                               | <b>RasL11a</b>                 | UBF   | (Pistoni et al., 2010)   |   |
|                               | Répresseurs                    | <b>P53</b>                                      | SL1  | (Zhai and Comai, 2000)                      |
|                               |                                | <b>RB/p130</b>                                  | UBF  | (Cavanaugh et al., 1995; Voit et al., 1997) |
| <b>CK2</b>                    |                                | SL1   | (Panova et al., 2006)  |   |
| <b>PTEN</b>                   |                                | SL1   | (Zhang et al., 2005)   |   |
| <b>P14 ARF</b>                |                                | UBF, TTF-I                                      | (Ayrault et al., 2006; Lessard et al., 2010)                     |   |
| <b>GSK3<math>\beta</math></b> |                                | SL1   | (Vincent et al., 2008)   |   |
| <b>JNK2</b>                   |                                | Rrn3  | (Mayer et al., 2005)   |   |

**Table 1 :** Activateurs et répresseurs de la transcription

cellulaire (exemple : voies MAP-Kinase et TOR) (Heix et al. 1998; Kuhn et al. 1998; Grummt 2010). Ces voies de signalisation induisent des modifications post traductionnelles des facteurs ce qui affecte leur activité voire l'inverse (Table 2). Par exemple, lorsque la cellule est en pleine croissance, le facteur TIF-IA est activé suite à sa phosphorylation par les voies mTOR et ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) (Grummt 2010). A l'inverse, en condition de stress, la phosphorylation de TIF-IA, sur un résidu différent, déstabilise l'interaction entre TIF-IA, l'ARN Pol I et SL1 empêchant ainsi la formation du PIC (Mayer et al. 2006a). Les carences nutritives diminuent également la transcription des ADNr notamment *via* l'hyper acétylation de la sous unité PAF53 de l'ARN Pol I ce qui réduit son l'affinité avec l'ADNr (Chen et al. 2013).

La transcription des ARNr est également contrôlée par des produits des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs (Table 1). Par exemple, la protéine retinoblastoma (RB) se lie au facteur UBF pour inactiver la transcription (Voit et al. 1997; Hannan et al. 2000). A l'inverse, les produits oncogènes tels que c-Myc ou encore la nucléophosmine (NPM) augmentent l'activité de l'ARN Pol I (Grummt 2010).

Chez les plantes, l'activité de l'ARN Pol I est aussi fortement influencée par les facteurs de croissance. Dans les années 1970, le groupe de Ricard a montré que l'activité de l'ARN Pol I est stimulée dans les racines de lentilles en réponse à l'auxine (Teissere et al. 1975). Un peu plus tard, des travaux menés par le groupe de Pikaard ont révélé que la cytokinine, hormone impliquée dans la croissance et la division cellulaire, induit une augmentation de la transcription des ADNr chez *A. thaliana* (Gaudino and Pikaard 1997). Chez les mammifères et la levure, la protéine kinase TOR intervient dans la régulation de l'expression des ADNr au cours de la prolifération et de la croissance cellulaire (Kunz et al. 1993; Li et al. 2006b; Tsang et al. 2010). Dans les années 2000, une protéine de type TOR a été décrite chez les plantes (Menand et al. 2002). Il a été montré que le domaine kinase de cette protéine est essentiel pour le développement de l'embryon et la synthèse des ARNr *via* son interaction directe avec le promoteur et la région 5'ETS des ADNr (Ren et al. 2011). Par ailleurs, la protéine ribosomale RPS6, cible de la voie TOR, est capable de modifier la structure chromatinienne des ADNr ce qui suggère un lien entre la voie TOR et la régulation de l'expression des ADNr (Kim et al. 2014).



| <b>Facteurs de transcription</b> | <b>Types de modification</b> | <b>Résidus</b>   | <b>Fonctions</b>   | <b>Références</b>   |
|----------------------------------|------------------------------|--|--|---|
| <b>UBF</b>                       | Phosphorylation              | - Ser488 (Cdk4-cyclin D1)<br>- Ser 388 (Cdk2-cyclin E/A)                 | Augmentation de l'activité   | (Voit et al. 1999)<br>(Voit and Grummt 2001)                        |
| <b>TAF<sub>168</sub></b>         | Acétylation                  | - Résidu non déterminé (PCAF)  | Augmente activité de SL1 et stimule la transcription   | (Muth et al. 2001)  |
| <b>TIF-IA</b>                    | Phosphorylation              | - Ser44, 633 et 649 (mTOR et ERK)<br>- Thr200 (JNK2)<br>- Ser 635 (AMPK) | Activation<br><br>Perte interaction avec ARN Pol I et SL1 et relocalisation vers le cytoplasme<br><br>Perte interaction avec SL1 | (Grummt 2010)<br><br>(Mayer et al. 2006)<br><br>(Hoppe et al. 2009) |
| <b>PAF53</b>                     | Acétylation                  | - Lys 373 (CBP)  | Diminution de la liaison ARN Pol I à l'ADN   | (Chen et al. 2013)  |
| <b>TAF<sub>110</sub></b>         | Phosphorylation              | - Thr 852 (Cdk1-cyclinB)   | Perte interaction SL1/UBF  | (Heix et al. 1998)  |

**Table 2 :** Modifications post traductionnelles des facteurs de régulation

## 2- Régulation du nombre de gènes d'ARNr actifs

### a- Les ADNr existent sous deux états chromatinien

Au sein de la cellule, seule une petite fraction des ADNr est exprimée (Grummt 2010). L'utilisation de différentes techniques telles que le Psoralen Crosslinking (PC) ou encore des digestions enzymatiques ont permis de déterminer la proportion de gènes transcriptionnellement actifs (Sogo and Thoma 2004). Le Psoralen est un agent qui s'intercale entre les deux brins d'ADN suite à une exposition aux Ultra-Violets (UV). En réagissant avec les thymines, il forme des liaisons covalentes entre les deux brins d'ADN. Les gènes transcriptionnellement actifs sont alors accessibles au Psoralen alors qu'au contraire, les gènes inactifs qui présentent une structure chromatinienne répressive, ne sont pas accessibles au Psoralen. Ces études ont permis de montrer que deux classes de gènes d'ARNr existent dans les cellules en croissance : les gènes actifs dépourvus de nucléosomes et associés aux transcrits naissants et les gènes inactifs, caractérisés par la présence de nucléosomes disposés de façon régulière le long des unités géniques. Ainsi chez les mammifères, il a été déterminé qu'approximativement 50% des ADNr étaient actifs (Conconi et al. 1989). En comparaison, chez le petit pois, seulement 5% des gènes d'ARNr sont transcrits (Shaw et al. 2002). En conséquence, les ADNr existent donc sous deux formes chromatinien : l'hétérochromatine, riche en nucléosomes, pour les gènes inactifs et l'euchromatine, contenant peu ou pas de nucléosomes ou bien des nucléosomes non canoniques, pour les gènes potentiellement actifs (Grummt and Pikaard 2003; McStay and Grummt 2008).

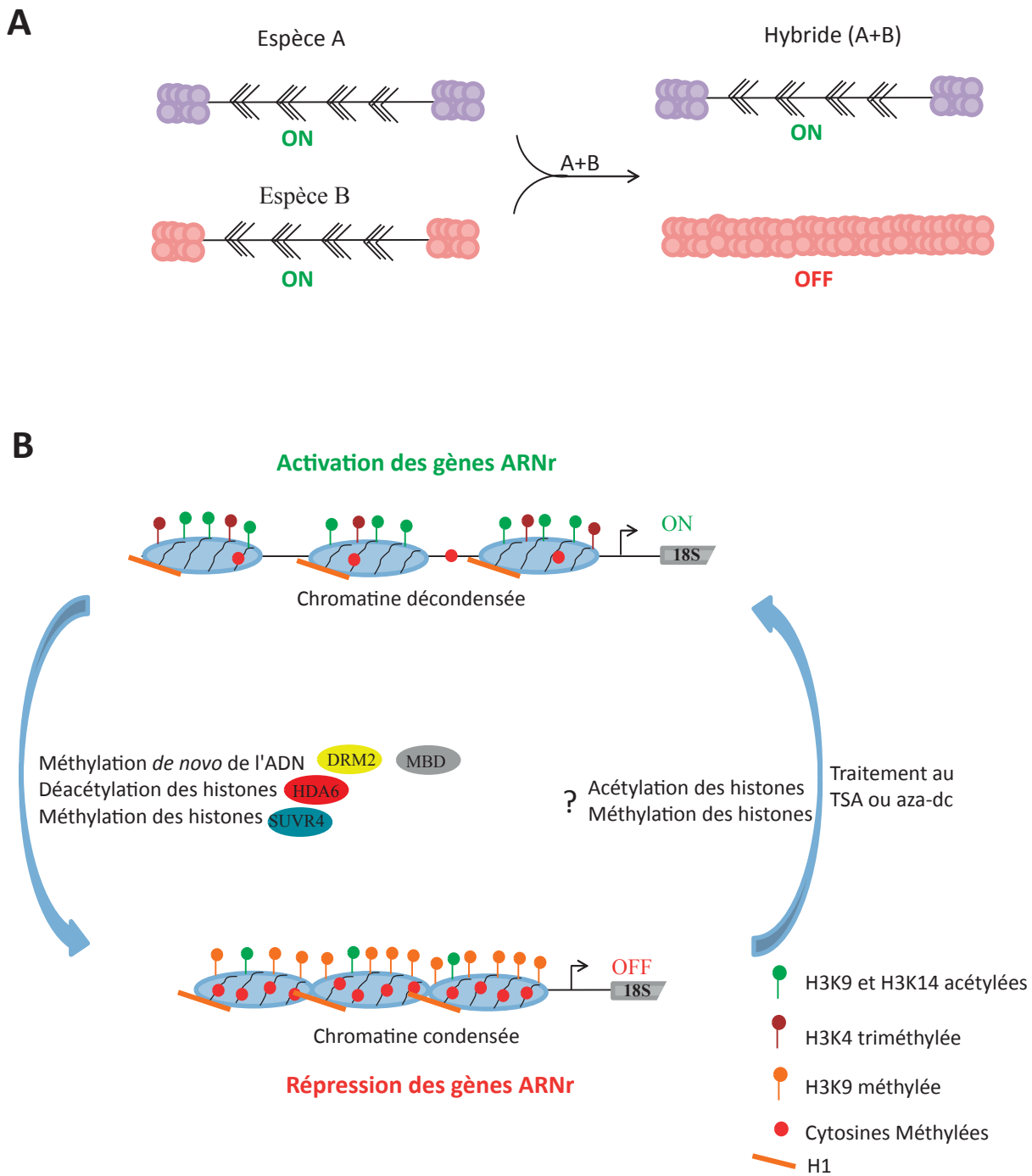
Le passage des gènes actifs vers inactifs est contrôlé par des modifications biochimiques de la chromatine, qualifiées d'épigénétiques (Grummt and Pikaard, 2003; McStay and Grummt, 2008; Preuss et al., 2008). Par exemple, chez les animaux, les gènes transcriptionnellement actifs sont caractérisés par une hypo méthylation de l'ADN, une hyper acétylation des histones H4 et la di-méthylation de l'histone H3K4 (H3K4<sub>me2</sub>). Au contraire, les gènes inactifs sont marqués par une hyper méthylation de l'ADN, une hypo acétylation de l'histone H4 et la méthylation de l'histone H3K9 et H3K20 (Grummt, 2007). Chez les plantes, les gènes actifs sont également peu méthylés, les histones H3 et H4 hyper acétylées et l'histone H3 di-méthylée sur la lysine K4 (H3K4<sub>me2</sub>). A l'inverse, les gènes inactifs

sont fortement méthylés, les histones H3 sont di et tri-méthylées (H3K9<sub>me2</sub>, H3K9<sub>me3</sub>, H3K20<sub>me3</sub>, H3K27<sub>me3</sub>) (Lawrence et al. 2004).

Les gènes d'ARNr réprimés sont contenus dans des masses surplombant le nucléole appelées NAC (Nucleolus Associated Chromatin) (Raska et al. 2006a; Stepinski 2014). Chez les plantes, une petite partie de ces gènes est également retrouvée dans le nucléole au sein des FCs suite à des extensions de chromatine condensée provenant des NACs (Bassy et al. 2000; Yano and Sato 2002; Sato and Sato 2010). Néanmoins, cette chromatine, renfermée au sein du FC, est potentiellement compétente c'est-à-dire qu'à tout moment, les gènes d'ARNr peuvent être transcrits (Yano and Sato 2002). Ainsi, en fonction des besoins cellulaires et des différents stades de développement, le ratio gènes ON/OFF peut varier. C'est le cas par exemple chez le soja : lorsque la température diminue fortement, la transcription des ADNr diminue suite à une condensation de la chromatine. Lorsque les plantules de soja sont réintégrées dans un milieu optimal pour la croissance, le nucléole devient très actif et la chromatine apparaît plus décondensée (Stepinski 2012b; Stepinski 2013).

#### b- La Dominance Nucléolaire

Lors du croisement entre deux espèces, aboutissant à la formation d'un hybride interspécifique, généralement les ADNr d'un seul parent sont exprimés alors que les autres sont réprimés (Figure 13A). Ce phénomène appelé la dominance nucléolaire a été mis en évidence pour la première fois en 1934 par Navashin suite à l'étude de plantes *Crepis* et de ses hybrides. Il a observé que le chromosome D, des différentes plantes et hybrides, présentait une morphologie différente en métaphase : 13 hybrides sur 21 ne formaient pas de régions satellites autour du chromosome. Il a appelé ce phénomène l'amphiplastie différentielle (Navashin 1934). La découverte des « NORs » par B. McClintock a permis par la suite de comprendre que ces régions satellites correspondaient aux constriction secondaires des NORs en métaphase (McClintock 1934). Ce phénomène a ensuite été décrit chez d'autres espèces telles que la drosophile, les amphibiens et les mammifères. Le terme de dominance nucléolaire est alors entré dans la communauté scientifique (Pikaard 2000).



**Figure 13:** Régulation de la structure chromatinienne des gènes d'ARNr au cours de la dominance nucléolaire

**A :** Principe de la dominance nucléolaire : répression des gènes d'ARNr provenant de l'un des deux parents chez l'espèce hybride. Cette répression est caractérisée par la condensation de la chromatine. **B :** Passage d'un état actif à un état inactif *via* des modifications chimiques et post traductionnelles de l'ADN et des histones. La méthylation de l'ADN associée à la déacétylation des histones H3 et H4 ainsi qu'à la méthylation des H3K9 conduit au passage d'un état actif vers un état inactif. Au contraire, la dé méthylation de l'ADN, l'hyper acétylation des histones H3 et H4 ainsi que la tri-méthylation de H3K4 induisent la décondensation de la chromatine et sa compétence transcriptionnelle. L'utilisation de traitement chimique (TSA ou aza-dc) favorise également l'établissement d'une chromatine favorable à la transcription. Cependant, les facteurs impliqués dans le passage d'un état chromatinien inactif vers un état actif restent encore à déterminer.

Les premières données moléculaires de la dominance nucléolaire ont été obtenues suite à l'étude d'hybrides du Xénope (Blackler and Gecking 1972; Honjo and Reeder 1973; Cassidy and Blackler 1974). En effet, le croisement entre les espèces *X. laevis* et *X. borealis* a révélé que seul les ARNr de *X. laevis* étaient transcrits. Ceci a permis de comprendre que l'expression des ARNr d'un seul parent était à la base de ce phénomène. Par la suite, la plupart des études ont été réalisées sur les plantes et notamment sur les genres *Arabidopsis* et *Brassicaceae*. Chez l'allotétraploïde *Arabidopsis suecica*, hybride issu du croisement entre *A. thaliana* et *A. arenosa*, les gènes issus d'*A. thaliana* sont réprimés (Chen et al. 1998). Chez *Brassicaceae napus*, les gènes issus de *B. rapa* sont actifs alors que ceux issus de *B. oleracea* sont réprimés (Chen and Pikaard 1997a). Au contraire, les gènes issus de *B. oleracea* et *B. rapa* sont actifs lorsqu'ils sont transformés dans les protoplastes de chacune de ces 3 espèces ce qui indique que l'intervention de facteurs de transcription espèce-spécifiques n'est pas responsable de la mise en place de la dominance nucléolaire (Frieman et al. 1999). Par la suite, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence que des modifications de la structure chromatinienne sont à l'origine du phénomène de la dominance nucléolaire (Pikaard 2002). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la méthylation de l'ADN (5-aza-2'-deoxycytosine ou aza-dc) ou des histones déacétylases (trichostatine A ou TSA) empêche la mise en place de la répression des gènes d'ARNr chez les espèces hybrides du blé, *Brassicaceae* ou encore d'*A. thaliana* (Neves et al. 1995; Chen and Pikaard 1997b; Lawrence et al. 2004). Par ailleurs, un crible génétique, utilisant des ARN doubles brins ciblant des histones déacétylases (HDAC), a permis de mettre en évidence l'importance de l'histone déacétylase HDA6 dans l'établissement de la dominance nucléolaire (Earley et al. 2006; Pontes et al. 2007). La diminution voire l'absence de cette protéine conduit à une baisse de la méthylation de l'ADN et à un enrichissement en histones H3K4<sub>me3</sub> et H3K9 et H3K14 acétylées, marques associées à une chromatine permissive. D'autres protéines interviennent également dans la mise en place de la dominance nucléolaire, telles que l'ADN méthyltransférase DRM2, les protéines MBD6 et MBD10, l'histone méthyltransférase SUV4 ou encore les protéines RDR2 et DCL3 (impliquées dans le RdDM, RNA Directed DNA Methylation) (Figure 13B et (Earley et al. 2006; Preuss et al. 2008; Pontvianne et al. 2012)).

Cependant, l'ensemble des gènes régulés par le phénomène de la dominance nucléolaire ne sont pas réprimés de façon permanente. Par exemple, au cours des premières étapes de la germination de la graine de l'hybride *A. suecica*, l'ensemble des gènes provenant d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa* sont exprimés (Pontes et al. 2007). De façon très intéressante, un phénomène similaire à la dominance nucléolaire a été observé chez *A. thaliana*. L'ensemble des ADNr sont exprimés au début de la germination de la graine puis une fraction est sélectivement réprimée au moment de l'émergence des vraies premières feuilles (Pontvianne et al. 2010). La répression spécifique de ces gènes est sous le contrôle des protéines SUVH5, SUVH6 et MET1 (Pontvianne et al. 2012; Pontvianne et al. 2013). Par ailleurs, l'inactivation de la protéine HDA6 soit par insertion d'ADN-T chez *A. thaliana*, soit par ARN interférence chez *A. suecica*, induit une décondensation des NORs ainsi qu'une diminution de la méthylation de l'ADN ce qui suggère que HDA6 joue un rôle capital dans la mise en place du « silencing » aussi bien chez l'hybride *A. suecica* (dominance nucléolaire) que chez l'espèce parente non hybride *A. thaliana* (Probst et al. 2004; Earley et al. 2010). Ainsi, au cours du développement, les gènes d'ARNr sont réprimés *via* la mise en place de modifications épigénétiques de la chromatine telles que la méthylation de l'ADN ou encore les modifications post traductionnelles des histones. Cependant, en fonction du contexte génomique (espèces hybrides ou non hybrides), l'ensemble de ces modifications sont guidées par différentes enzymes.

c- Modification du ratio de gènes ON/OFF : régulation épigénétique

Les modifications épigénétiques de la chromatine définissent la structure chromatinienne des gènes et par conséquent leur compétence transcriptionnelle. Cette structure permissive ou réprimée est contrôlée par l'action synergique de plusieurs acteurs : la méthylation de l'ADN, les modifications post traductionnelles des histones ainsi que la position et composition des nucléosomes contrôlées par des complexes de remodelage chromatinien et des histones chaperonnes.

## 1) Les modifications chimiques de l'ADN et des histones

**La méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN est souvent associée à la répression transcriptionnelle (Grummt and Pikaard 2003; McStay and Grummt 2008). Chez la souris, des travaux ont montré une corrélation entre le taux de méthylation de l'ADN et l'inhibition de la transcription (Bird et al. 1981; Santoro and Grummt 2001). La méthylation d'une seule cytosine (en position -133 en amont du TIS) est suffisante pour bloquer la liaison du facteur UBF sur le promoteur du gène et donc inactiver la transcription. En revanche, la transcription n'est pas affectée si l'ADN est dépourvu de nucléosomes ce qui suggère un lien entre la méthylation de l'ADN et la chromatine (Santoro and Grummt 2001). Par ailleurs, chez les céréales, des études menées sur la dominance nucléolaire ont montré un lien entre l'accessibilité de la chromatine et le taux de méthylation de l'ADN (Flavell et al. 1988; Houchins et al. 1997). De même, l'utilisation d'un inhibiteur de la méthylation (5-aza-2'-deoxycytosine ou aza-D) permet d'induire la réactivation d'une population de gènes qui étaient totalement réprimée (Viera et al. 1990; Chen and Pikaard 1997a).

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est majoritairement concentrée sur les sites CpG. Elle est guidée par 3 types d'ADN méthyltransférases (DNMT) : la DNMT1, impliquée dans la maintenance de la méthylation à chaque cycle de réplication, la DNMT2, homologue de DNMT1, dont la fonction est peu connue à ce jour et la DNMT3, responsable de la méthylation *de novo* (Robertson 2002; Chen and Li 2004). Chez les plantes, la méthylation de l'ADN intervient dans différents contextes à savoir CG, CNG et CNN, (N pouvant être A, T ou C) (Tariq and Paszkowski 2004). Chez *A. thaliana*, la méthylation *de novo* est dirigée par la protéine DRM2 (homologue de DNMT3), et la maintenance de la méthylation est assurée par trois enzymes différentes : MET1 (homologue de DNMT1), responsable de la méthylation des sites CG, CMT3 des sites CNG et DRM1/DRM2 et CMT2 des sites CHH (Law and Jacobsen 2010; Zemach et al. 2013). La protéine DDM1 (Deficient in DNA Methylation 1) joue un rôle indirect dans la méthylation. C'est une protéine proche de la famille du complexe de remodelage SWI/SNF2 (SWItch/Sucrose NonFermentable). Elle est capable de remodeler le nucléosome *in vitro* (Jeddeloh et al. 1999; Brzeski and Jerzmanowski 2003) et de faciliter l'accès de CMT2 au niveau de la chromatine contenant l'histone H1

(Zemach et al. 2013). De plus, sa mutation induit une forte diminution de la méthylation de l'ADN ainsi que des histones H3K9 (revu par (Chan et al. 2005)).

### La modification des histones

L'acétylation des histones, catalysée par les histones acétyl-transférases (HAT), est principalement dirigée sur les résidus lysines des histones H3 et H4 (Table 3). Définie comme une marque permissive à la transcription, elle masque les charges positives des histones permettant alors de réduire les contacts ADN-histones (Hsieh and Fischer 2005) et de favoriser l'accès des ARN polymérase et des facteurs de transcription sur le promoteur des gènes (Wang et al. 2009). Au contraire, la déacétylation des histones, catalysée par les histones déacétylases (HDAC), est un processus nécessaire permettant d'une part, la méthylation des histones et d'autre part, le recrutement de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1), impliquée dans la compaction de l'ADN (Lachner et al. 2001; Lachner and Jenuwein 2002). Chez *A. thaliana*, HDA6 joue un rôle essentiel dans la répression des séquences répétées ainsi que dans le phénomène de la dominance nucléolaire (Probst et al. 2004; Earley et al. 2006). Par ailleurs, en interagissant directement avec MET1, HDA6 participe au maintien de la méthylation de l'ADN (Liu et al. 2012) et à la mémoire épigénétique (Blevins et al. 2014).

La méthylation des histones est catalysée par les histones méthyl-transférases (HMT) et leur dé-méthylation est contrôlée par les histones déméthylases (HDM). Selon le niveau de méthylation (mono, di ou tri méthylation) et le résidu et/ou l'histone concerné, la méthylation peut avoir un impact différent sur la stabilité du nucléosome (Table 3). Par exemple, la di-méthylation de H3K9 (H3K9<sub>me2</sub>) est une marque combinée à une chromatine inactive en transcription alors que la tri-méthylation de H3K4 (H3K4<sub>me3</sub>) est associée aux zones transcriptionnellement actives (Grummt and Pikaard 2003; Lawrence et al. 2004; Grummt and Ladurner 2008). Plus récemment, chez la levure, il a été montré que la méthylation de l'histone H2A sur le résidu glutamine 105 est exclusivement enrichie sur les ADN<sub>r</sub> 35S et influence le processus transcriptionnel *via* le positionnement du complexe FACT sur le gène (Facilitates Chromatin Transcription) (Tessarz et al. 2014).

Il est important de noter que la méthylation de l'ADN et des histones sont des marques intimement liées. En effet, chez *Neurospora crassa* et *A. thaliana*, une diminution



|           | Site de modification |                   | Type de modification |                     | Fonction                               |
|-----------|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------|--|
|           | <i>A. thaliana</i>   | <i>H. sapiens</i> | <i>A. thaliana</i>   | <i>H. sapiens</i>   |  |
| <b>H3</b> | K4                   | K4                | Méthylation          | Méthylation         | Activation transcription               |
|           | K9                   | K9                | Méthylation          | Méthylation         | Répression transcription               |
|           | K9                   | K9                | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K14                  | K14               | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K18                  | K18               | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K23                  | K23               | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K27                  | K27               | Méthylation          | Méthylation         | Répression transcription               |
|           |                      | K27               | -                    | Acétylation         | ?                                      |
|           | K36                  | K36               | Méthylation          | Méthylation         | Activation et Répression transcription |
|           | K79                  |                   | Méthylation          | Répression télomère |  |
| <b>H4</b> |                      |                   |                      |                     |  |
|           | K5                   | K5                | Acétylation          | Acétylation         | Répression transcription               |
|           | K8                   | K8                | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K12                  | K12               | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           | K16                  | K16               | Acétylation          | Acétylation         | Activation transcription               |
|           |                      | K20               | -                    | Méthylation         | Silencing hétérochromatine             |

**Table 3 :** Modifications des histones H3 et H4 (Zhang et al. 2007)

considérable de la méthylation de l'ADN est observée en absence des HMT (Tamaru and Selker 2001; Jackson et al. 2002). De plus, récemment il a été montré que l'ADN méthyltransférase CMT3 est associée aux H3K9<sub>me2</sub> (Du et al. 2012) et que l'histone méthyltransférase KRYPTONITE/SUVH4 se fixe sur l'ADN méthylé pour induire la méthylation de H3K9 (Du et al. 2014). De même, les HMTs possèdent des domaines de liaison aux cytosines méthylées (MBD) ce qui suggère que la méthylation de l'ADN peut diriger la méthylation des histones (Zhang and Reinberg 2001).

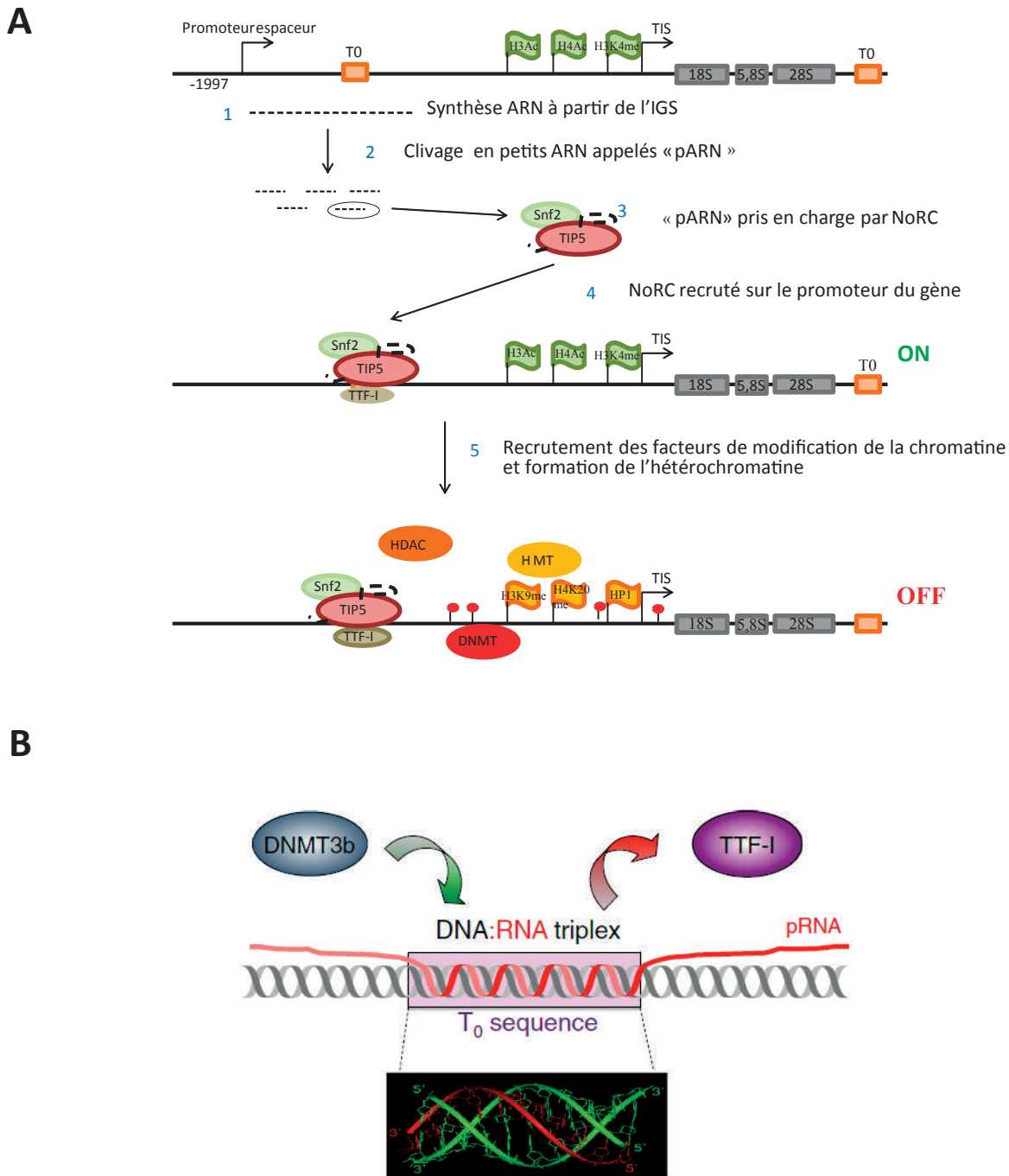
Les histones sont également la cible d'autres types de modifications chimiques. Par exemple, la phosphorylation des histones ou encore l'ubiquitination sont des marques qui affectent la structure chromatinienne des gènes. Chez les mammifères, l'ubiquitination de l'histone H2B est associée aux gènes actifs et permet le recrutement du complexe COMPASS impliqué dans la méthylation des histones H3K4 et H3K76 (Shilatifard 2006; Minsky et al. 2008). Chez *A. thaliana*, l'histone H2B mono-ubiquitinée est également associée aux gènes actifs et permet de moduler rapidement l'expression des gènes au cours de la photo morphogénèse (Bourbousse et al. 2012).

## 2) Remodelage de la chromatine

Les complexes de remodelage de la chromatine sont des complexes multi protéiques ATP dépendants qui ont pour principal rôle de modifier l'accessibilité de certaines régions génomiques aux différents complexes transcriptionnels et facteurs de transcription. Il existe au moins quatre familles de facteurs de remodelage: SWI/SNF, ISWI, MI-2 et INO80-SWR1 (Clapier and Cairns 2009). Parmi ces derniers, les complexes NoRC, eNoSC (energy-dependent Nucleolar Silencing Complex), CSB (Cockayne Syndrome group B) et CSA (Cockayne Syndrome protein A) impliqués soit dans la répression des gènes d'ARNr (NoRC et eNoSC) soit dans leur activation (CSB et CSA) chez les animaux.

### **Complexe NoRC (Figure 14):**

Le complexe NoRC est responsable de la formation de l'hétérochromatine conduisant à la répression des ADNr (Santoro et al. 2002). Ce complexe, identifié chez les mammifères, est composé d'une ATPase SNF2 et de la protéine TIP5 qui interagit avec le



**Figure 14 :** Répression des gènes d'ARNr chez les mammifères

**A :** Rôle du complexe NoRC dans la répression des gènes d'ARNr. Des transcrits intergéniques sont synthétisés à partir de l'IGS (étape 1) et clivés en petits ARN appelés « pARN » (étape 2). Ces pARN sont complémentaires au promoteur des ADNr et sont pris en charge par le complexe NoRC composé de deux sous unités : Snf2 et TIP5 (étape 3). Par la suite, NoRC est recruté sur le promoteur des ADNr *via* son interaction avec le facteur TTF-I (étape 4). TIP5 interagit avec différents facteurs tels que les HDAC, HMT et DNMT qui vont instaurer des marques répressives à la transcription (étape 5). En conséquence, il y a condensation de l'ADN et formation d'hétérochromatine (adapté de (Grummt, 2007)). **B :** Répression des ADNr en absence du complexe NoRC. Le pARN se fixe sur le site T<sub>0</sub> des ADNr par complémentarité de séquence. Il se forme alors un triplex ADN:ARN reconnu par la DNMT3b qui va induire la méthylation du promoteur des ADNr et par conséquent, leur répression. TTF-I est alors remplacé par les pARN ce qui permet de renforcer la répression (Grummt and Langst, 2013).

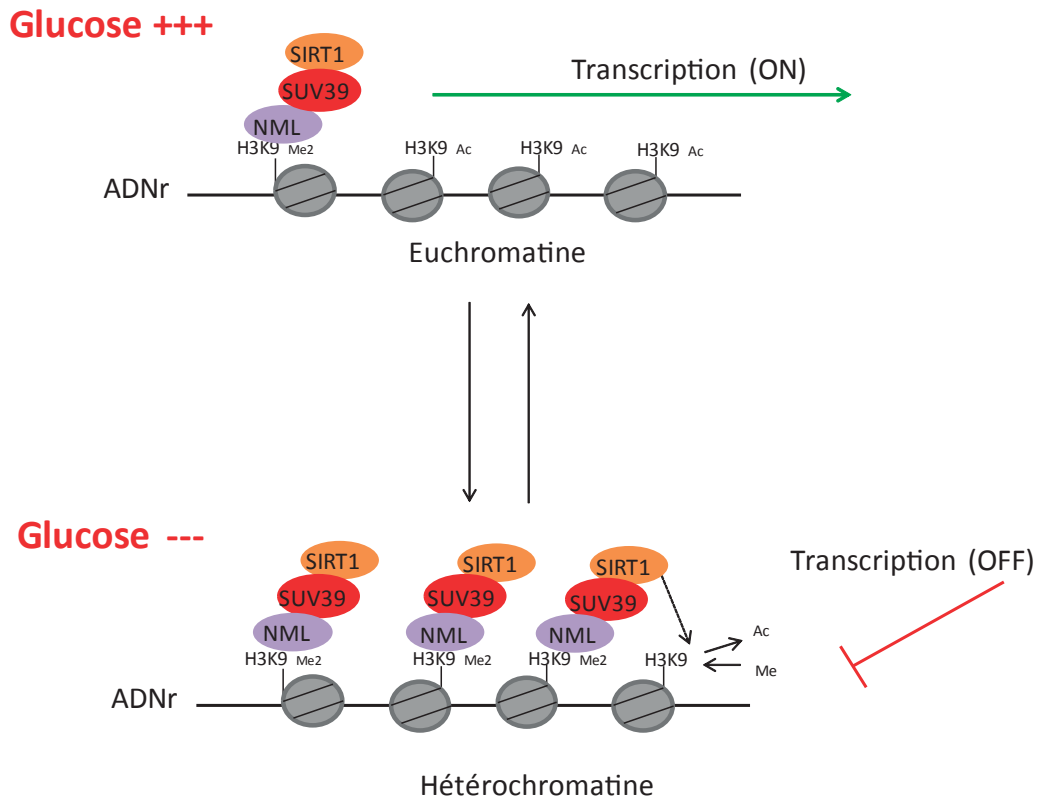
facteur TTF-I permettant son recrutement sur le promoteur proximal des ADNr (Strohner et al. 2001). Par la suite, NoRC recrute les protéines DNMT1 et DNMT3 ainsi que le complexe HDAC Sin3-like permettant l'établissement de la méthylation *de novo* sur le promoteur du gène (Figure 14A et (Santoro et al. 2002; Zhou et al. 2002; Santoro and Grummt 2005)). En conséquence, le facteur UBF ne peut plus se lier au promoteur. Le verrouillage chromatinien est par la suite amplifié par l'action des HMTs et de la protéine HP1 afin d'aboutir à la formation d'une structure condensée et transcriptionnellement inactive (Grummt and Pikaard 2003). La fonction du complexe NoRC est dépendante de l'interaction existant entre la protéine TIP5 et des petits ARN non codants appelés pARN. Ces derniers proviennent de la transcription ARN Pol I à partir des IGS et sont complémentaires de la séquence promotrice du gène (Mayer et al. 2006b; Mayer et al. 2008; Santoro et al. 2010). Leur absence induit la perte d'interaction du complexe NoRC avec le promoteur et par conséquent, l'activation de la transcription (Mayer et al. 2008). Des travaux plus récents proposent également que ces pARN sont capables d'initier la répression indépendamment de la présence de TTF-I et du complexe NoRC (Schmitz et al. 2010). En se fixant sur le site T0 du promoteur, ils forment un triplex ADN-ARN, reconnu par la DNMT3 qui induit la méthylation *de novo* (Figure 14B).

Le complexe NoRC est aussi capable de déplacer les nucléosomes sur le promoteur en aval du TIS, empêchant ainsi la formation du PIC (Li et al. 2006c). Ainsi, le complexe NoRC a deux fonctions majeures dans le « gene silencing » : d'une part, c'est un complexe de remodelage qui comme son nom l'indique, altère la position du nucléosome sur le promoteur des ADNr et d'autre part, il représente une plateforme d'assemblage des facteurs intervenant dans la modification des histones et de l'ADN. Il semblerait également que NoRC participe à la formation de l'hétérochromatine au niveau des centromères et des télomères ce qui montre son importance dans la stabilité du génome (Postepska-Igielska et al. 2013).

Cependant, chez les plantes, aucun complexe homologue à NoRC n'a été pour le moment identifié.

### **Complexe eNoSC (Figure 15):**

La synthèse des ARNr est principalement déterminée par les capacités nutritionnelles de la cellule. Un lien entre le niveau énergétique de la cellule et la transcription des ADNr a été établi suite à l'identification du complexe eNoSC chez les



**Figure 15 :** Répression des gènes d'ARNr en réponse au changement énergétique de la cellule

En condition normale, le promoteur des ADNr est déméthylé et les histones acétylées. La chromatine est alors peu condensée et la transcription favorisée. En revanche, lorsque les conditions cellulaires sont modifiées notamment en manque de glucose, le ratio  $NAD^+/NADH$  augmente et active la protéine SIRT1, sous unité du complexe eNoSC. SIRT1 induit la déacétylation des histones H3K9 et SUV39 leur di-méthylation. La protéine NML se fixe sur l'histone H3K9<sub>Me2</sub> et se déplace de proche en proche le long de l'unité génique favorisant la propagation des marques répressives. La transcription des ADNr est alors inhibée et la chromatine condensée (Schéma adapté de (Murayama et al., 2008)).

animaux (Murayama et al. 2008). eNoSC est un complexe nucléolaire NAD<sup>+</sup> dépendant composé de trois protéines : la nucléométhyline (NML), la protéine SIRT1 (HDAC) et la protéine SUV39 (HMT). Des changements dans la balance NAD<sup>+</sup>/NADH, induits par des modifications de l'état énergétique cellulaire (carence en glucose), activent la protéine SIRT1 qui mène à la déacétylation des histones. En parallèle, la protéine SUV39, de par son interaction avec NML et SIRT1, méthyle les histones. La NML se lie aux histones H3K9<sub>me2</sub> et se déplace de proche en proche permettant de propager la formation de l'hétérochromatine tout au long de la séquence. La répression des ADNr permet à la cellule d'économiser de l'énergie et de se protéger de l'apoptose en attendant la restauration de la balance énergétique.

### **Complexe CSB et CSA:**

Contrairement aux processus de répression, peu d'informations sont connues concernant les facteurs impliqués dans l'activation des ADNr. Néanmoins, quelques facteurs ont été identifiés dont le complexe CSB et la protéine CSA (Yuan et al. 2007; Koch et al. 2014). CSB est un complexe appartenant à la famille SWI/SNF qui joue un rôle important dans la régulation des 3 systèmes transcriptionnels ainsi que dans les mécanismes de transcription couplés à la réparation de l'ADN (Beerens et al. 2005; Yuan et al. 2007). Localisé dans le nucléole, ce complexe interagit avec TTF-I et participe à l'activation transcriptionnelle des gènes. CSB se lie à l'ARN Pol I et recrute une HMT : G9a qui induit la di-méthylation de H3K9 au cours de l'élongation (Yuan et al. 2007). La protéine CSA a récemment été identifiée comme un facteur de transcription de l'ARN Pol I. Dans le nucléole, CSA interagit avec l'ARN Pol I et les ADNr actifs puis recrute les facteurs TFII-H (Transcription Factor II Human) et CSB afin de stimuler un nouveau cycle de transcription (Koch et al. 2014).

De manière intéressante, des orthologues au complexe CSA ont été identifiés chez *A. thaliana*. En effet, il a été montré que les protéines AtCSA1A et AtCSA1B sont impliquées dans les processus de réparation de l'ADN couplés à la transcription, en réponse à un stress UV-B (Biedermann and Hellmann 2010; Zhang et al. 2010b). Chez les mammifères, les protéines CSA et CSB participent à l'assemblage des complexes de réparation de l'ADN au cours de l'élongation transcriptionnelle au niveau des cassures de l'ADN (Fousteri et al.

2006; Laine and Egly 2006). Des fonctions similaires semblent ainsi être conservées entre les protéines CSA et CSB chez les plantes et les mammifères. Il n'est alors pas exclu que chez les plantes, ces protéines puissent également participer au remodelage de la chromatine des gènes d'ARNr.

### *3) Les histones chaperonnes et la composition du nucléosome*

Les processus d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes sont guidés par des histones chaperonnes. Par exemple, la protéine NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) est impliquée dans l'assemblage et le désassemblage des dimères H2A-H2B au cours de la réplication alors que le complexe FACT intervient dans l'enlèvement des dimères H2A-H2B au cours de l'élongation transcriptionnelle (Eitoku et al. 2008). Chez les mammifères, la nucléoline, connue pour son rôle dans la biogenèse des ribosomes, s'associe également avec les dimères H2A-H2B et le variant macro H2A. De plus, une activité semblable à celle de FACT a été mise en évidence (Angelov et al. 2006) (Cf. Section III-B-2e). Le complexe CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1), quant à lui, participe à l'assemblage du tétramère H3-H4 et Asf1 (Anti Silencing Function 1) à son désassemblage (Eitoku et al. 2008).

Parfois, en dehors du processus de réplication, les histones sites canoniques peuvent être remplacées au sein du nucléosome par d'autres histones appelées « variants » qui sont des iso formes alléliques des histones canoniques, conservées chez la plupart des organismes pluricellulaires. Plusieurs variants ont été identifiés et il semblerait que chacun d'entre eux joue un rôle spécifique dans les mécanismes de régulation de la transcription, du « silencing » ou encore de réparation de l'ADN (Zhu et al. 2012; Volle and Dalal 2014). Chez les mammifères, le variant H2A.Z est localisé à proximité du promoteur des ADNr et participe à l'activation de la transcription (Nemeth et al. 2008; van de Nobelen et al. 2010) alors que le variant macroH2A participe à la répression des ADNr (Cong et al. 2014). De même, chez la Carpe, la présence de nucléosomes contenant le variant H2A.Z est corrélée à une augmentation de la transcription (Simonet et al. 2013). Chez *A. thaliana*, il a été démontré que le variant H2A.Z joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement de la plante ainsi que dans la réponse au stress (March-Diaz et al. 2008; March-Diaz and Reyes 2009; Kumar and Wigge 2010).

### III- La Nucléoline

La nucléoline est une des protéines non ribosomales la plus abondante du nucléole pouvant représenter jusqu'à 10% du contenu total du nucléole (Andersen et al. 2005). Etudiée depuis de nombreuses années, la nucléoline est essentiellement connue pour son rôle majeur dans la biogenèse des ribosomes. Cependant, de nombreux travaux ont révélé que la nucléoline est une protéine impliquée dans divers processus cellulaires incitant ainsi à considérer cette dernière comme une protéine multifonctionnelle jouant un rôle très important dans l'activité cellulaire et l'intégrité du génome (Tuteja and Tuteja 1998; Ginisty et al. 1999; Mongelard and Bouvet 2007).

#### A- Découverte et description de la nucléoline

La nucléoline a été décrite pour la première fois en 1973 dans des extraits protéiques chez le rat et définie sous la dénomination « C23 » à cause de sa position sur gel bi-dimensionnel (Orrick et al. 1973). Elle a également été caractérisée comme protéine de « 100 KDa » bien que la masse moléculaire théorique lui étant attribuée n'est que de 77 KDa (Lapeyre et al. 1985; Lapeyre et al. 1987). Cette différence de taille s'explique principalement par sa composition en acide aminés dans la région N-terminale, cible de modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation (Cf. Section III-A3). Aujourd'hui, le terme couramment utilisé pour définir cette protéine est la nucléoline.

#### 1- Organisation et structure de la nucléoline

La nucléoline est une protéine fortement conservée chez les organismes eucaryotes. Elle est codée par un seul gène par génome haploïde chez les mammifères (Bourbon et al. 1988; Srivastava et al. 1989; Maridor and Nigg 1990) ainsi que chez la levure (Kondo and Inouye 1992; Gulli et al. 1995). En revanche, chez certaines espèces, les protéines nucléoline peuvent être codées par deux voire plusieurs gènes : par exemple, trois gènes ont été identifiés chez la Carpe (*C. carpio*) et deux ont été caractérisés chez les amphibiens (*X. laevis*) (Messmer and Dreyer 1993; Quezada et al. 2006). La redondance génomique de ces gènes peut en partie s'expliquer par le fait que ces espèces sont des organismes tétraploïdes issus d'événements d'allotétraploïdisation (Taylor et al. 2001; Uno



et al. 2013). Récemment, une nouvelle protéine de type nucléoline (NRP, Nucleolin Related Protein) a été identifiée dans les cellules germinales chez le rat. Cependant, cette protéine ne possède pas de domaine N-terminal, essentiel pour les activités reliées à la dynamique de la chromatine (Chathoth et al. 2009). Chez les végétaux, au moins deux gènes codant les protéines nucléoline ont été répertoriés (Cf. Section III-C).

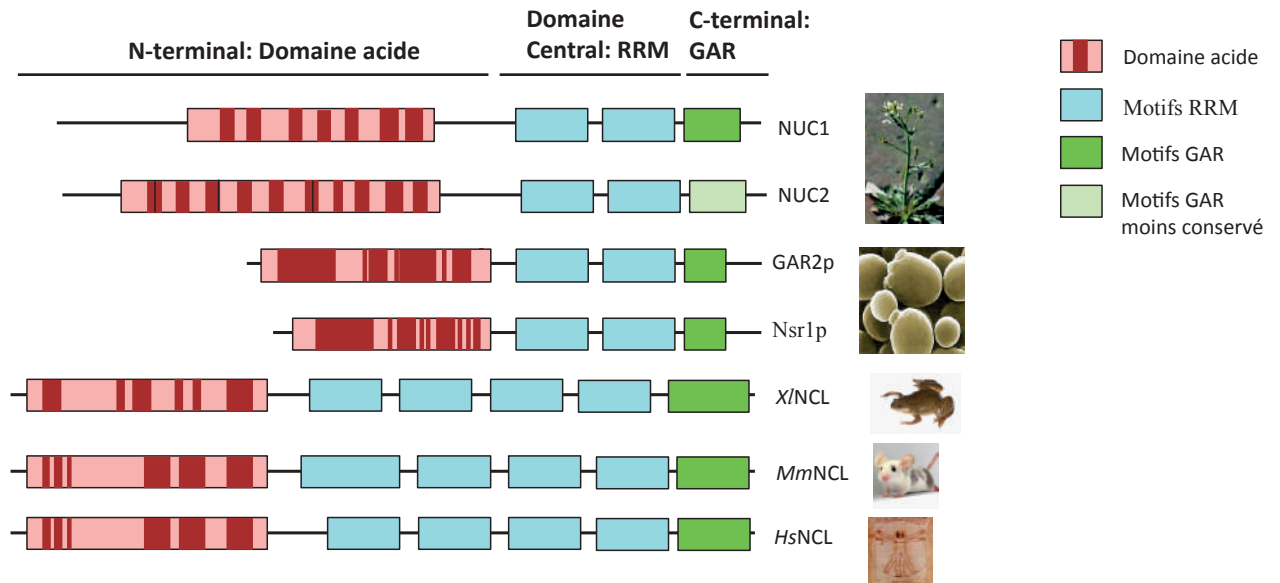
La structure des protéines nucléoline est relativement bien conservée entre les différents organismes (Ginisty et al. 1999; Mongelard and Bouvet 2007). La nucléoline est organisée en 3 domaines distincts (Figure 16A) :

- Le domaine N-terminal : Ce domaine est composé de séquences répétées riches en acides aminés acides (glutamate et aspartate) et séparées par des résidus sérines, acides aminés basiques. Le nombre et la longueur des séquences acides varient en fonction des espèces. Par exemple, chez les plantes, les stretches acides sont plus nombreux mais plus courts que chez les mammifères (Tajrishi et al. 2011). Ce domaine est principalement impliqué dans les interactions protéines-protéines et semble conférer à la nucléoline son activité de chaperonne d'histone (Cf. Section III-B-2e). Il a été proposé que les acides aminés acides permettent à la nucléoline d'interagir avec l'histone H1 et de ce fait, de modifier la structure chromatinienne des gènes (Erard et al. 1988; Angelov et al. 2006). Cette hypothèse est soutenue par divers travaux qui ont montré que le domaine acide est nécessaire pour l'activité des histones chaperonnes telles que NAP1 ou encore B23 (Okuwaki et al. 2001; Chakravarthy et al. 2005).

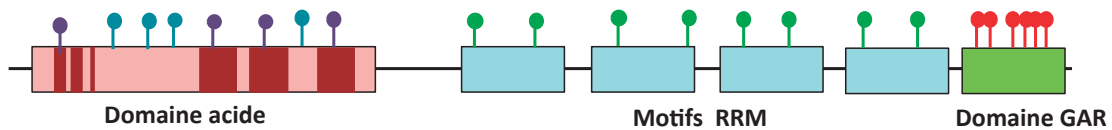
- Le domaine Central : Ce domaine est caractérisé par la présence de plusieurs motifs de liaison à l'ARN appelés RRM (RNA Recognition Motif). Quatre motifs RRM ont été identifiés chez les mammifères contre seulement deux chez les levures et les plantes (Bourbon et al. 1988; Srivastava et al. 1989; Gulli et al. 1995; Pontvianne et al. 2007). Ces motifs présentent une forte affinité pour les acides nucléiques et ribonucléiques (Ginisty et al. 1999). Ils sont importants pour la liaison de la nucléoline avec les pré-ARNr puisque ces derniers se lient fortement aux séquences NRE (Nucleolin Recognition Element) « <sup>U/G</sup>CCCG<sup>A/G</sup> » localisées dans la région 5'ETS du précurseur ARNr (Ghisolfi-Nieto et al. 1996; Serin et al. 1996; Finger et al. 2004).

- Le domaine C-Terminal : Connu aussi sous le nom de domaine GAR (Glycine- and Arginine- Rich) ou encore RGG (Arg-Gly-Gly), ce dernier est riche en résidus glycines et

**A**



**B**



- Méthylation
- N-glycosylation
- Phosphorylation sérine
- Phosphorylation thréonine

**Figure 16** : Structure tripartite de la nucléoline

**A** : Représentation des différents domaines de la protéine nucléoline chez *A. thaliana* (NUC1 et NUC2), *S. pombe* (GAR2p), *S. cerevisiae* (Nsr1p), *X. laevis* (X/NCL), *M. musculus* (MmNCL) et l'homme (HsNCL). Chaque domaine est représenté par une couleur différente. **B** : Modifications post traductionnelles de la nucléoline.

arginines. Il est lui aussi impliqué dans les interactions protéines-protéines (notamment avec les protéines ribosomiques) et de façon non spécifique avec des acides nucléiques afin de renforcer la liaison RRM/ARN (Ghisolfi et al. 1992).

## 2- Localisation de la nucléoline

La localisation intracellulaire de la nucléoline a fait l'objet de nombreuses études. C'est une protéine essentiellement nucléolaire localisée à la jonction FC/DFC et parfois dans le GC (Bugler et al. 1982; Escande et al. 1985; Martin et al. 1992) ce qui fait de la nucléoline une protéine activement impliquée dans les processus de transcription et de maturation des pré-ARNr.

La nucléoline possède un signal de localisation nucléaire (NLS) lui permettant d'être dirigée vers le noyau (Ginisty et al. 1999). Des analyses menées *via* les techniques de FRAP et de FRET ont révélé que la nucléoline exerce un va et vient rapide entre le nucléole et le nucléoplasme (Chen and Huang 2001). Cependant aucun signal de localisation nucléolaire n'a été identifié suggérant que sa localisation est déterminée grâce à son affinité avec d'autres protéines ou composants nucléolaires (Ginisty et al. 1999).

En fonction des différentes conditions cellulaires, la localisation de la nucléoline varie. Par exemple, au cours de la mitose, suite à la dislocation du nucléole, la nucléoline est relocalisée vers les PNBs (Gas et al. 1985; Medina et al. 1995; Dundr et al. 2000). En réponse à différents stress, la nucléoline est également relocalisée vers le nucléoplasme et même vers le cytoplasme suite à sa phosphorylation par la protéine p34<sup>cdc2</sup> (Schwab and Dreyer 1997; Daniely and Borowiec 2000; Daniely et al. 2002; Kim et al. 2005). Plusieurs travaux ont également montré que la nucléoline peut s'associer à la membrane cytoplasmique des cellules animales et servir de récepteur extra membranaire (Ginisty et al. 1999; Srivastava and Pollard 1999). L'ensemble de ces travaux lui valent aujourd'hui d'être considérée comme une potentielle cible dans la thérapie génique contre le cancer (Koutsioumpa and Papadimitriou 2014).

### 3- Modifications post traductionnelles de la nucléoline

La nucléoline est la cible de nombreuses modifications post traductionnelles (phosphorylation, méthylation, ADP ribosylation, acétylation...) qui sont réparties sur l'ensemble de ses domaines (Figure 16B et (Ginisty et al. 1999)).

La phosphorylation de la nucléoline est la modification la plus connue et décrite à ce jour. Elle régule sa fonction, sa protéolyse et sa localisation au cours du cycle cellulaire (Belenguer et al. 1989; Peter et al. 1990; de Carcer et al. 1997; Gulli et al. 1997). Par ailleurs, chez les animaux, sa phosphorylation est souvent accompagnée d'une augmentation transcriptionnelle des ADNr (Bouche et al. 1987; Suzuki et al. 1991). Cette transcription serait associée au clivage du domaine N-terminal de la nucléoline suite à sa phosphorylation par la kinase CKII et à sa liaison avec les transcrits ARNr naissant (Bourbon et al. 1983; Bouche et al. 1984; Warrenner and Petryshyn 1991). Cependant, des travaux plus récents suggèrent que la nucléoline régule la transcription en agissant directement avec le complexe ARN Pol I et/ou les ADNr et non *via* une interaction avec les transcrits naissants (Roger et al. 2002).

Chez les plantes, la nucléoline est également fortement phosphorylée dans les cellules méristématiques c'est-à-dire en division ce qui suggère que la phosphorylation de la nucléoline est intimement liée à l'activité cellulaire et à la production des ARNr (Gonzalez-Camacho and Medina 2004).

La nucléoline est également la cible d'autres modifications post traductionnelles telles que la méthylation (Raman et al. 2001), la glycosylation (Carpentier et al. 2005; Losfeld et al. 2009), l'ADP-ribosylation (Leitinger and Wesierska-Gadek 1993) ou encore l'acétylation (Choudhary et al. 2009; Das et al. 2013). Ces modifications semblent être importantes pour la localisation et/ou l'activité de la nucléoline. Par exemple, la méthylation de la nucléoline, localisée au niveau de son domaine C-terminal (Lapeyre et al. 1986), module l'interaction nucléoline/ARN (Raman et al. 2001). Chez les mammifères, la glycosylation est nécessaire pour son expression au niveau de la surface cellulaire (Losfeld et al. 2009). La nucléoline acétylée au niveau de la lysine 88 est localisée dans le nucléoplasme et co-localise avec des

facteurs d'épissage ce qui suggère un rôle potentiel de la nucléoline dans la maturation des ARNm transcrits par l'ARN Pol II (Das et al. 2013).

## **B- La nucléoline : une protéine multifonctionnelle**

### **1- La nucléoline et la biogenèse des ribosomes**

De nombreux travaux ont permis de souligner l'implication de la nucléoline dans la biogenèse des ribosomes, plus particulièrement dans la transcription ARN Pol I, la maturation des précurseurs ARNr ainsi que l'assemblage des ARNr en pré-particules (Ginisty et al. 1999).

#### **Régulation transcriptionnelle ARN Pol I**

Chez tous les eucaryotes, la nucléoline est majoritairement localisée à la jonction FC/DFC, site de transcription des ADNr (Ginisty et al. 1999). Diverses études cytologiques ont permis d'établir une corrélation positive entre l'abondance de la nucléoline, le taux de transcription ARN Pol I et le taux de prolifération cellulaire (Mongelard and Bouvet 2007).

Chez les vertébrés, l'augmentation de la nucléoline induit une stimulation de la transcription par l'ARN Pol I (Bouche et al. 1987). A l'inverse, la nucléoline est délocalisée du DFC suite à l'inhibition de la transcription ce qui montre son rôle dans la transcription des ADNr (Escande et al. 1985). Dans les cellules humaines, l'inactivation du gène nucléoline par ARN interférence diminue la transcription ARN Pol I et cette diminution est corrélée au degrés d'inactivation du gène nucléoline (Rickards et al. 2007). De plus, la baisse du nombre de précurseurs ARNr, conséquence de la diminution de la transcription, est associée à une augmentation des marques répressives telles que H3K9<sub>me2</sub> alors qu'à l'inverse, la sur expression de la nucléoline induit une augmentation des marques actives H3K4<sub>me3</sub> et H4K12<sub>Ac</sub> (Cong et al. 2012) ce qui suggère que la nucléoline joue un rôle important dans le maintien d'une structure favorable à la transcription des gènes d'ARNr. Chez le poulet, l'absence de la nucléoline induit non seulement une inhibition de la transcription mais aussi une modification de la forme et de la structure du nucléole (Storck et al. 2009). Cette désorganisation du nucléole est similaire aux effets observés suite à l'inactivation de l'ARN Pol I par l'actinomycine D ou à l'inhibition du facteur TIF-IA (Puvion-Dutilleul et al. 1992;

Yuan et al. 2005; Ugrinova et al. 2007). L'ensemble de ces données suggèrent donc que la nucléoline agit comme un activateur de la transcription. Pourtant, certains travaux vont à l'encontre de ces résultats et définissent la nucléoline plutôt comme un répresseur de la transcription. Par exemple, l'injection de protéine nucléoline dans les oocytes de *Xenopus* induit une diminution drastique du nombre de molécule ARN Pol I et des précurseurs 40S (Roger et al. 2002). De même, l'injection d'anticorps anti-nucléoline, chez *chironomus tentans*, augmente de 2 à 3.5 fois le taux de transcription (Egyhazi et al. 1988). Il est important de prendre en compte que ces analyses sont réalisées à partir de micro-injections et donc que la répression transcriptionnelle observée pourrait s'expliquer suite à des effets de compétitions ou un défaut de concentration de certains facteurs au cours des expériences. Néanmoins, la nucléoline semble présenter une dualité fonctionnelle concernant son rôle dans la transcription ARN Pol I (Cf. Introduction Section IV, Review).

Par ailleurs, plusieurs travaux attribuent à la nucléoline un rôle dans l'organisation chromatinienne des ADNr. En effet, il a été démontré que la nucléoline interagit avec des séquences ADNr non transcrites localisées en amont du TIS et qu'elle est capable de se lier aux histones H1 et à l'extrémité N-terminale de l'histone H3 (Olson and Thompson 1983; Erard et al. 1988; Roger et al. 2002; Heo et al. 2007). Plus récemment, une activité chaperonne d'histone a été décrite chez les mammifères montrant que la nucléoline est capable de moduler l'organisation chromatinienne en agissant sur les nucléosomes (Angelov et al. 2006). D'autre part, d'autres travaux montrent que la nucléoline inhibe la liaison du facteur TTF-I sur le promoteur T0 empêchant ainsi le recrutement du complexe NoRC (Cong et al. 2012). Ceci montre l'importance de la nucléoline dans le maintien d'une structure permissive à la transcription.

Chez les plantes, dans les cellules d'oignon, il a été montré que la nucléoline co-localise avec une protéine similaire au facteur de transcription UBF (reconnue par des anticorps), ce qui suggère son implication dans la transcription ARN Pol I (de Carcer and Medina 1999). Par la suite, l'ensemble des travaux réalisés sur la plante modèle *A. thaliana* ont permis de mieux comprendre le rôle de la nucléoline dans la régulation de la transcription des ADNr (Kojima et al. 2007; Pontvianne et al. 2010). En effet, la mutation du

gène *NUC1* induit une désorganisation du nucléole ainsi qu'une augmentation de la transcription associée à une accumulation des ARN Pol I sur le promoteur et la région codante des ADNr (Pontvianne et al. 2007). De plus, la chromatine des gènes d'ARNr est décondensée et l'expression des variants est affectée, plus particulièrement l'expression du *VAR1*, normalement réprimée dans les plantes sauvages (Pontvianne et al. 2007; Pontvianne et al. 2010). Cette accumulation de transcrits *VAR1* s'explique par une diminution de la méthylation symétrique en CG alors qu'aucune modification des histones n'est observée (Pontvianne et al. 2010). Ces données suggèrent que la nucléoline régule l'expression des ADNr *via* la méthylation et par conséquent qu'elle joue un rôle dans l'organisation chromatinienne des ADNr comme chez les animaux et les levures. Chez le maïs, il a également été montré que l'accumulation de la nucléoline induit la réactivation transcriptionnelle des ADNr au cours de la germination de la graine ce qui souligne encore une fois le rôle de la nucléoline dans la transcription des ADNr (Villa-Hernandez et al. 2013).

### **Maturation et assemblage des ARNr**

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle de la nucléoline dans la maturation des pré-ARNr. Chez *S. pombe*, une accumulation des précurseurs 35S et une diminution des ARNr 18S matures sont observées en absence de la protéine GAR2p, homologue de la nucléoline chez les animaux (Gulli et al. 1995). Dans les mutants *nsr1p* chez *S. cerevisiae*, la maturation des précurseurs est fortement ralentie (Kondo and Inouye 1992; Lee et al. 1992): les précurseurs 20S sont quasiment absents et la synthèse des précurseurs 35S est bloquée (Lee et al. 1992). De plus, les précurseurs 35S s'accumulent et une perte de la méthylation des ARNr 18S est observée (Kondo and Inouye 1992). Par ailleurs, en réponse au froid, les souches mutantes *nsr1p* présentent une diminution drastique de la maturation des précurseurs ce qui suggère l'importance de la nucléoline dans la réponse au stress thermique (Kondo et al. 1992). De manière intéressante, chez les vertébrés, au cours de la transcription, la nucléoline s'associe à la région 5'ETS des transcrits naissants ce qui suggère son rôle dans les premières étapes de la maturation des pré-ARNr (Ghisolfi-Nieto et al. 1996; Serin et al. 1996). Chez la souris, l'interaction entre la nucléoline et les pré-ARNr stimule le clivage *in vitro* des précurseurs ARNr dans la région 5'ETS. Plus tard, il a été montré que la nucléoline interagit avec le complexe de maturation U3 snoRNP (Ginisty et al. 1998). La

nucléoline s'associe avec le motif conservé « UCGA » dans la séquence du précurseur, localisé quelques nucléotides en aval du premier site de clivage dans la région 5'ETS. Cette association est nécessaire pour la formation du complexe de maturation (Ginisty et al. 2000).

Chez les plantes, il a été montré que la nucléoline co-purifie avec le complexe U3 snoRNP et interagit *in vitro* avec l'ADNr et les pré-ARNr chez les *Brassicacea* ce qui suggère que chez les plantes, la nucléoline participe également aux premières étapes de la maturation des pré-ARNr (Saez-Vasquez et al. 2004a; Saez-Vasquez et al. 2004b). De plus, chez *A. thaliana*, la mutation du gène nucléoline (*NUC1*) affecte fortement l'accumulation des pré-ARNr au site P alors qu'à l'inverse, les transcrits non maturés diminuent (Pontvianne et al. 2007).

La nucléoline participe également au processus d'assemblage des ARNr en particules pré-ribosomiques. En effet, la nucléoline s'associe de façon transitoire avec les transcrits ARNr naissants et des protéines ribosomiques (Bouvet et al. 1998; Ginisty et al. 1999). En se liant aux ARNr *via* ses domaines RRM, la nucléoline induit la formation de structures secondaires des pré-ARNr (Sipos and Olson 1991). La nucléoline pourrait alors être considérée comme une molécule chaperonne permettant le repliement correct de l'ARNr pendant la transcription et ainsi l'association des protéines ribosomiques pour former les pré-ribosomes. Cette hypothèse est soutenue par des travaux montrant que l'ajout de nucléoline, dans des oocytes stade IV de *X. laevis*, provoque un mauvais assemblage des particules pré-ribosomiques 40S (Roger et al. 2003).

## 2- Les autres fonctions cellulaires de la nucléoline

### a- La nucléoline et les ARNm

La capacité de la nucléoline à se lier avec les ARN *via* ses domaines RRM rend envisageable son implication dans la régulation post transcriptionnelle des ARN. Diverses études ont montré que la nucléoline participe à la stabilisation de nombreux ARNm tels que l'interleukine-2 (*IL-2*) (Chen et al. 2000), *Bcl-X<sub>L</sub>* (Zhang et al. 2008) ou encore *CD154* (Singh et al. 2004). De plus, une analyse du transcriptome, par microarray, a montré que de nombreux ARNm sont ciblés par la nucléoline (Abdelmohsen et al. 2011). Plus récemment, une étude a révélé que la nucléoline acétylée sur la lysine 88 co-localise avec des facteurs d'épissage tels



que SC35 et Y12 (Das et al. 2013) ce qui suggère un rôle potentiel de la nucléoline dans l'épissage des ARNm.

La nucléoline intervient également dans la régulation traductionnelle des ARNm. La protéine P53 est un suppresseur de tumeur qui joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'apoptose et la progression du cycle cellulaire en réponse à différents stress chez les animaux. La nucléoline régule la traduction de cette protéine *via* différentes interactions protéiques. D'une part, la liaison de la nucléoline et de la protéine RPL26 sur la région 5'UTR de l'ARNm P53 contrôle la traduction de P53 en réponse aux lésions de l'ADN (Takagi et al. 2005; Chen et al. 2012). Ainsi, la surexpression de la nucléoline affecte la traduction des ARNm P53 alors qu'à l'inverse sa diminution favorise leur expression (Takagi et al. 2005). D'autre part, la nucléoline interagit avec la protéine MDM2 (connue aussi sous le nom de HDM2), une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de la protéine P53 (Saxena et al. 2006; Bhatt et al. 2012). La structure tridimensionnelle de la nucléoline va définir sa fonction et de ce fait, affecter l'activité de la protéine MDM2 et la stabilité de la protéine P53 (Bhatt et al. 2012). Le domaine N-terminal de la nucléoline se lie au domaine RING de MDM2 alors que les motifs RRM s'associent avec les signaux de localisation NLS/NES (Nuclear Export Signal). La surexpression des motifs RRM inhibe l'activité de MDM2 ce qui conduit à la stabilisation de la protéine P53.

#### b- La nucléoline et le métabolisme de l'ADN

La nucléoline est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la réplication, la réparation ou encore la recombinaison de l'ADN.

Plusieurs travaux suggèrent un rôle de la nucléoline dans la réplication de l'ADN. Par exemple, suite à un stress cellulaire, la nucléoline interagit avec la protéine RPA (Replication Protein A) et inhibe la réplication (Daniely and Borowiec 2000). La nucléoline s'associe également avec la télomérase et les séquences répétées télomériques (TTAGGG) *in vitro* et *in vivo* supposant que cette dernière participe à la réplication et la maintenance des télomères (Pollice et al. 2000; Khurts et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que la nucléoline interagit avec l'hélicase WRN (Werner Syndrome) et est capable d'inhiber sa fonction d'hélicase mais pas son activité d'exonucléase (Indig et al. 2012).

La nucléoline est également impliquée dans la réparation et les processus de recombinaison de l'ADN. En effet, la nucléoline interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans ces mécanismes telles que les protéines topoisomérase I (Bharti et al. 1996; Edwards et al. 2000), RPA (Daniely and Borowiec 2000) ou encore p53 (Daniely et al. 2002). La nucléoline est aussi associée au complexe RAD51 et cette interaction semble importante pour réguler les mécanismes de réparation de l'ADN (De et al. 2006). De récents travaux ont révélé que la nucléoline est un possible interactant de l'histone H2A.X, marqueur des DSB (Kobayashi et al. 2012). Des analyses de CHIP ont montré que la nucléoline s'accumule autour des DSB et que cette accumulation est dépendante de la présence de H2A.X. En absence de la nucléoline, l'activité de réparation diminue ainsi que le nombre de facteurs impliqués dans la HR (Homologous Recombination) et NHEJ (Non-Homologous End-Joining) (Kobayashi et al. 2012). De plus, il semblerait que la nucléoline induise la dissociation des dimères H2A/H2B nécessaire pour le recrutement de la protéine RPA et la réparation de l'ADN (Goldstein et al. 2013). La nucléoline est recrutée *via* le complexe MRE11-NBS1-RAD50 grâce à son interaction avec RAD50 et participe au désassemblage des dimères H2A/H2B. La diminution de la nucléoline induit une diminution de la réparation due à la baisse de la dissociation des nucléosomes.

### c- La nucléoline et le stress

#### **Stress biotique :**

La nucléoline interagit avec un grand nombre de virus et de bactéries chez les animaux (Masiuk 2010). Plusieurs travaux ont mis en avant le rôle de la nucléoline dans la réplication virale (Calle et al. 2008; Jiang et al. 2010b; Strang et al. 2010; Strang et al. 2012), la morphogénèse des particules virales (Balinsky et al. 2013), l'attachement cellulaire des virus (Bose et al. 2004) ou encore le trafic viral (Greco et al. 2012).

Chez les plantes, la nucléoline semble également jouer un rôle dans le cycle de la réplication virale (Jiang et al. 2010b). En effet, la sur expression de la nucléoline NSR1p et/ou NUC1 chez *N. benthamiana* réduit fortement l'accumulation du virus et inhibe sa réplication *in vitro*. En se fixant sur la région 3'UTR du tombusvirus, la nucléoline inhibe sa réplication.

D'autres travaux ont aussi mis en évidence le rôle de la nucléoline dans les infections bactériennes. Par exemple, la nucléoline constitue un récepteur de surface pour la bactérie *Francisella tularensis* LVS (Live Vaccine Strain) (Barel et al. 2010) ou *E. coli* (EPEC) (Dean and Kenny 2011). Lorsque les cellules sont infectées par l'entérobactérie EPEC, la nucléoline est relocalisée vers le cytoplasme où elle est séquestrée à la surface cellulaire de ses micro colonies au niveau de la barrière intestinale. L'utilisation de ligands à la nucléoline permettrait de diminuer l'entrée de la bactérie mais n'affecterait pas son ancrage.

### **Stress abiotique :**

Chez les animaux, en réponse à divers stress, la nucléoline est relocalisée vers le nucléoplasme suite à de nouvelles interactions protéiques. Par exemple, au cours d'un choc thermique ou bien d'un stress génotoxique, la nucléoline inhibe la réplication de l'ADN en s'associant avec la protéine RPA (Daniely and Borowiec 2000; Kim et al. 2005). Par ailleurs, en réponse au stress oxydatif, la stabilisation de la nucléoline par la protéine HSP70, inhibe l'apoptose (Jiang et al. 2010a; Zhang et al. 2010a; Wang et al. 2012). La protéine HSP70 s'accumule dans le nucléole, et stabilise la nucléoline en diminuant son clivage suite aux effets du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Chez les plantes, quelques travaux ont permis de mettre en évidence un lien entre la nucléoline et la réponse au stress. Par exemple, chez le petit pois (*Pisum sativum*), une accumulation de transcrits *PsNUC-L* est détectée en réponse à une stimulation lumineuse (Tong et al. 1997) et chez le cresson (*Lepidium sativum*), une augmentation de la protéine nucléoline est observée en réponse à la gravité (Sobol et al. 2007). Chez le riz (*O. sativa*), il a également été montré que la sur expression des transcrits *OsNUC1* augmente la résistance au stress salin (Sripinyowanich et al. 2013). Chez *A. thaliana*, il semblerait que la NUC2 soit impliquée dans la réponse au stress thermique (Cf. Résultats, Partie II).

#### d- La nucléoline et la régulation transcriptionnelle ARN Pol II

La nucléoline est retrouvée associée à plusieurs complexes transcriptionnels ARN Pol II. Par exemple, la nucléoline appartient au complexe activateur LR1, impliqué dans la transcription des gènes codant les chaînes légères IgG des lymphocytes B (Hanakahi et al.

1997), et est également associée à des complexes répresseurs comme le complexe D4Z4, impliqué dans la répression des séquences répétées sur le chromosome 4q35 (Gabellini et al. 2002). D'autre part, la nucléoline est impliquée dans la régulation de la transcription de plusieurs gènes tels que le gène Krüppel-like factor 2 (*KLF2*) (Huddleson et al. 2006), *CDC34* et *Bcl2* (Grinstein et al. 2007a; Grinstein et al. 2007b), *cPLA<sub>2</sub>* (Tsou et al. 2008) ou encore *Ccnd1* (Allinne et al. 2014).

Chez *A. thaliana*, la mutation du gène *NUC1* affecte l'expression de nombreux gènes transcrits par l'ARN Pol II. Par exemple, une analyse transcriptomique du mutant *nuc1* a révélé une augmentation du nombre de transcrits *NUC2* et une diminution des ARNm codant les protéines ribosomiques induites en réponse au sucre (Kojima et al. 2007; Pontvianne et al. 2007).

#### e- La Nucléoline et la chromatine

Précédemment, nous avons pu voir que l'absence de la nucléoline affecte la structure chromatinienne des ADNr aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Cependant, comment cette protéine intervient dans les mécanismes de régulation de la chromatine reste encore à déterminer. Chez les mammifères, la nucléoline stimule le remodelage des nucléosomes (Angelov et al. 2006) et sa déplétion affecte la dynamique des histones (Gaume et al. 2011) ce qui suggère que la nucléoline affecte probablement l'accessibilité de l'ADN *via* deux fonctions : activité chaperonne d'histone et activité de co-remodelage.

#### **La nucléoline en tant que co-remodeleur**

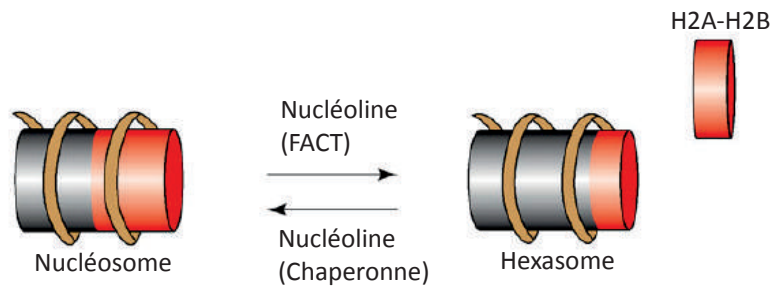
Chez les animaux, la nucléoline agit comme un co-remodeleur de la chromatine puisqu'elle affecte l'activité des complexes de remodelage de la chromatine : ACF (ATP-dependent Chromatin assembly and remodeling Factor) et SWI/SNF (Angelov et al. 2006). Une reconstitution de nucléosome *in vitro* a permis de montrer qu'en présence de nucléoline, l'efficacité de remodelage du nucléosome augmente et ce, de façon dépendante à sa quantité. Les complexes SWI/SNF et ACF à eux seuls ne sont pas capables de remodeler les nucléosomes contenant le variant macroH2A (Doyen et al. 2006). De manière

intéressante, en présence de la nucléoline, le remodelage de nucléosomes contenant le variant macroH2A est induit mais pas ceux contenant le variant H2ABbd. Ainsi, l'activation ou bien l'inactivation des complexes de remodelage de la chromatine est spécifique aux facteurs associées au remodelage et à la composition du nucléosome. Cependant, comment la nucléoline affecte l'efficacité de remodelage de ces complexes reste à déterminer.

### **La nucléoline en tant qu'histone chaperonne (Figure 17)**

Il semblerait que l'efficacité de déposition des dimères H2A/H2B soit très similaire entre les protéines nucléoline et NAP1 (Angelov et al. 2006). Par ailleurs, la nucléoline affecte la dynamique des histones H2A - H2B et facilite le passage de l'ARN Pol II au cours de la transcription (Mongelard and Bouvet 2007). La capacité de la nucléoline à dissocier les dimères H2A/H2B est un élément essentiel pour comprendre son activité de co-remodeleur. En effet, le désassemblage des dimères conduit probablement à la déstabilisation du nucléosome ce qui permet le passage des complexes de remodelage. Par ailleurs, la nucléoline possède aussi une activité semblable au complexe FACT. FACT est une histone chaperonne qui facilite la dissociation des dimères H2A/H2B afin de permettre le passage de l'ARN Pol II au travers de la barrière nucléosomale (Belotserkovskaya et al. 2003). Des analyses de transcription *in vitro* ont permis de montrer que la nucléoline facilite la transcription et induit le désassemblage des dimères H2A/H2B tout comme le facteur FACT (Angelov et al. 2006).

De manière intéressante, plusieurs similitudes entre la nucléoline et le complexe FACT ont été observées. En effet, d'une part, FACT est un complexe protéique composé de deux sous unités suppressores conservées chez les eucaryotes: Ty16 (SPT16 : suppressor of Ty) et SSRP1 (Structure-Specific Recognition Protein 1) (Belotserkovskaya et al. 2003). La grande sous unité Ty16 contient une région acide dans son extrémité C-terminale, caractéristique des histones chaperonnes et retrouvée également chez la nucléoline (Ginisty et al. 1998; Philpott et al. 2000). La petite sous unité SSRP1 possède des motifs HMG qui confèrent à la protéine une affinité de liaison non spécifique pour l'ADN (Orphanides et al. 1999). En parallèle, la nucléoline est capable de se lier de façon non spécifique à l'ADN (Hanakahi et al. 1999). De plus, il semblerait que la nucléoline et le complexe FACT soient impliqués tous deux dans les mécanismes de recombinaison homologue. En effet, FACT



**Figure 17:** Les différentes activités FACT et chaperonne d'histone de la nucléoline

*In vitro*, la nucléoline, de façon très similaire au complexe FACT, induit la déstabilisation du nucléosome et la formation d'un hexasome suite au désassemblage des dimères H2A-H2B. Ceci facilite le passage de l'ARN Pol II le long de la chromatine au cours de l'élongation transcriptionnelle. Au contraire, son activité de chaperonne d'histone lui permet de reformer la structure nucléosomale après le passage de l'ARN polymérase (adapté de ((Mongelard and Bouvet, 2007))).

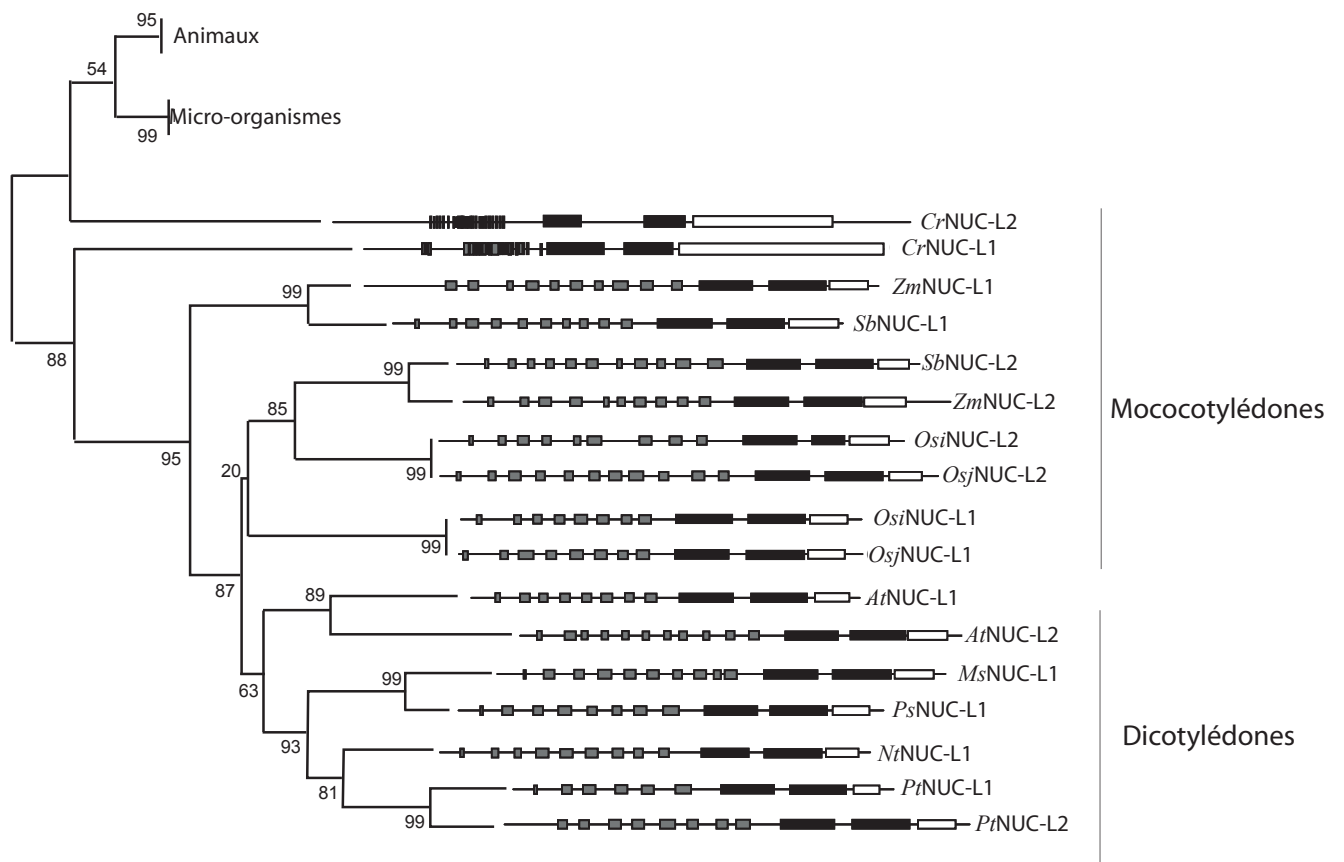
interagit avec les séquences V(D)J, signal de recombinaison homologue (Belotserkovskaya et al. 2004). Chez les mammifères, la nucléoline interagit avec RAD51, protéine qui joue un rôle central dans le processus de recombinaison homologue (De et al. 2006). Des études récentes ont également souligné l'importance de la nucléoline et de son activité FACT-like dans la réparation des DSB (Kobayashi et al. 2012; Goldstein et al. 2013).

En ce qui concerne les plantes, aucune donnée ne mentionne les protéines nucléoline comme étant des histones chaperonnes. Cependant, des travaux récemment publiés montrent que les protéines nucléoline NUC1 et NUC2 chez *A. thaliana* se lient aux nucléosomes et que la protéine NUC1 est capable d'assister le remodelage du nucléosome en présence du complexe RSC (Chromatin Structure Remodeling) (Cf. Résultats, Partie I.A).

Pour résumer, la nucléoline est une protéine multifonctionnelle impliquée dans divers processus cellulaires indispensables à la survie cellulaire. La nucléoline régule l'expression des gènes transcrits par les ARN Pol I et II sans doute *via* des activités chaperonnes d'histones et de co-remodeleur de la chromatine. De plus, la nucléoline semble jouer un rôle très important dans la réplication, la réparation et les mécanismes de recombinaison de l'ADN ce qui souligne son importance dans la stabilité du génome.

## C- La nucléoline chez les plantes

Contrairement aux mammifères et aux levures, le génome des plantes contient au moins deux gènes codant pour les protéines de type nucléoline. Par exemple, trois gènes de la nucléoline ont été décrits chez la luzerne (*Medicago sativa*) et deux gènes chez le maïs (*Zea Mays*), le sorghum (*Sorghum bicolor*), le riz (*Oriza Sativa*), le peuplier (*Populus trichocarpa*) et l'Arabette des dames (*Arabidospis thaliana*) (Bogre et al. 1996; Pontvianne et al. 2007; Saez-Vasquez and Medina 2008). Cette duplication est conservée chez les monocotylédones et les dicotylédones. Ces protéines présentent toutes la même organisation structurale que celle retrouvée chez les mammifères et levures, mis à part la présence de seulement deux domaines RRM (Figure 18 et (Tajrishi et al. 2011)). La présence de gènes dupliqués suggère que ces protéines peuvent intervenir de façon spécifique dans le



**Figure 18 :** Arbre phylogénétique des protéines nucléoline de différentes plantes

Arbre phylogénétique généré à l'aide du logiciel MEGA4 avec la méthode du « Neighbour Joining » associée à 1000 bootstraps. Les valeurs des bootstraps sont représentées à chaque nœud. La structure des protéines nucléoline est également représentée pour chaque espèce végétales : *A.thaliana* : Q9FVQ1 (*AtNUC-L1*) et Q1PEP5 (*AtNUC-L2*), *O.sativa indica* : A2YS16 (*OsiNUC-L1*) et A2XXP3 (*OsiNUC-L2*), *O.sativa japonica* : Q6Z1C0 (*OsjNUC-L1*) et Q7XTT4 (*OsjNUC-L2*), *S.bicolor* : Sb07g005510 (*SbNUC-L1*) et Sb01g019710 (*SbNUC-L2*), *Z.mays* : FGP025 (*ZmNUC-L1*) et FGT019 (*ZmNUC-L2*), *P.trichocarpa* : 002310655 (*PtNUC-L1*) et 002307174 (*PtNUC-L2*), *M.sativa* : T09648 (*MsNUC-L1*), *N.tabacum* : Q8LNZ4 (*NtNUC-L1*), *P.sativum* : T06458 (*PsNUC-L1*) (Abou-Ellail M, résultats non publiés).



développement de la plante ou bien en réponse à différentes conditions environnementales (Magadum et al. 2013).

La nucléoline a été détectée pour la première fois dans des cellules d'oignon avec un anticorps dirigé contre la nucléoline de mammifère (de Carcer et al. 1997). Un peu plus tard, une analyse par spectrométrie de masse montre que la « nucléoline » est une protéine AG-NOR (Gonzalez-Camacho and Medina 2004). Des études menées chez les crucifères ont permis de montrer que la nucléoline est associée au complexe de maturation des ARNr U3 snoRNP (Saez-Vasquez et al., 2004, 2004a).

Chez *A. thaliana*, 2 gènes codant des protéines nucléoline ont été identifiés : *NUC1* (anciennement appelé *AtNUC-L1/PARL1*) et *NUC2* (*AtNUC-L2*) sur les chromosomes respectifs 1 et 3 (Kojima et al. 2007; Petricka and Nelson 2007; Pontvianne et al. 2007). La présence de cette duplication peut sans doute s'expliquer suite à plusieurs évènements de polyploïdisation survenus au cours de l'évolution. Ces deux protéines sont très similaires mis à part le domaine acide plus long et le domaine GAR moins conservé pour la *NUC2*.

Le gène *NUC1* est exprimé de façon constitutive et intense dans les conditions normales de croissance (Kojima et al. 2007; Petricka and Nelson 2007; Pontvianne et al. 2007). Son expression augmente en fonction de la quantité de sucre et cette augmentation est associée à la synthèse des ribosomes, indispensable pour la croissance (Kojima et al. 2007). L'inhibition de l'expression du gène fonctionnel *NUC1*, par insertion d'ADN-T, affecte fortement le développement et la croissance de la plante. La longueur des racines est réduite et les feuilles apparaissent plus petites, pointues et ciselées (Petricka and Nelson 2007; Pontvianne et al. 2007) tout comme dans les mutants des protéines ribosomiques (Van Lijsebettens et al. 1994; Ito et al. 2000; Horiguchi et al. 2011) ou encore des facteurs impliqués dans la maturation des ARNr (Abbasi et al. 2010; Lange et al. 2011) ce qui suggère un lien entre la protéine *NUC1* et la biogenèse des ribosomes. L'absence de la protéine *NUC1* affecte également l'expression des variants des ADNr 45S et plus particulièrement l'expression du *VAR1* (Pontvianne et al. 2010). De plus, les mutants *nuc1* présentent un nucléole totalement déstructuré et une décondensation totale de la chromatine des ADNr associée à une hypo méthylation de l'ADN (Pontvianne et al. 2007; Pontvianne et al. 2010)

ce qui montre que la protéine NUC1 est impliquée dans l'organisation chromatinienne des ADNr.

De façon très intéressante, l'absence de la NUC1 induit la sur expression du gène *NUC2* ce qui suggère que la NUC2 complémente, du moins partiellement, l'absence de la NUC1 (Pontvianne et al. 2007). En revanche, la double mutation *nuc1nuc2* est létale ce qui indique que les deux gènes sont fonctionnels et nécessaires pour la survie de la plante (Cf. Résultats, Partie I.A). Le gène *NUC2* est plus faiblement exprimé que le gène *NUC1* sauf dans les tissus méristématiques apicaux et racinaires (Pontvianne et al. 2007). En revanche, peu de données sont disponibles concernant le rôle de la NUC2 au sein de la plante. Les premiers résultats obtenus au cours de la thèse d'Abou-Ellail M. laissent penser que la NUC2 est une protéine induite en réponse au stress (Abou-Ellail 2011).

L'analyse moléculaire du mutant *nuc1* a permis de mettre en évidence que la protéine NUC1 est l'homologue fonctionnel de la nucléoline chez les animaux et la levure. Le maintien du gène *NUC2* chez *A. thaliana* et chez l'ensemble des espèces végétales suggère que ce gène présente soit une redondance fonctionnelle à la *NUC1* soit une spécialisation fonctionnelle appelée « sous-fonctionnalisation » comme cela a déjà été démontré pour de nombreux gènes chez *A. thaliana* (Hartung et al. 2007; Charon et al. 2012; Jiang et al. 2013).

## IV- Review : “ Nucleolin : Dual roles in rDNA chromatin transcription”



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## Review

## Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription

Nathalie Durut, Julio Sáez-Vásquez\*

CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, 66860 Perpignan, France

Univ. Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, F-66860 Perpignan, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 July 2014

Received in revised form 8 September 2014

Accepted 9 September 2014

Available online xxxxx

## Keywords:

Nucleolin

rDNA

Chromatin

Epigenetics

Nucleolus

RNA pol I

## ABSTRACT

Nucleolin is a major nucleolar protein conserved in all eukaryotic organisms. It is a multifunctional protein involved in different cellular aspects like chromatin organization and stability, DNA and RNA metabolism, assembly of ribonucleoprotein complexes, cytokinesis, cell proliferation and stress response. The multifunctionality of nucleolin is linked to its tripartite structure, post-translational modifications and its ability of shuttling from and to the nucleolus/nucleoplasm and cytoplasm. Nucleolin has been now studied for many years and its activities and properties have been described in a number of excellent reviews.

Here, we overview the role of nucleolin in RNA polymerase I (RNAPI) transcription and describe recent results concerning its functional interaction with rDNA chromatin organization. For a long time, nucleolin has been associated with rRNA gene expression and pre-rRNA processing. However, the functional connection between nucleolin and active versus inactive rRNA genes is still not fully understood. Novel evidence indicates that the nucleolin protein might be required for controlling the transcriptional ON/OFF states of rDNA chromatin in both mammals and plants.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nucleolin was first described in 1973 in rat protein extracts and initially called “C23” because of its mobility on a two-dimensional gel (Orrick et al., 1973). Nucleolin was also described as a 100–110 kDa protein, although its predicted molecular weight is around 77 kDa (Lapeyre et al., 1986). This discrepancy was attributed to its N-terminal amino acid composition (reviewed by (Ginisty et al., 1999)). Now, the name of nucleolin is widely used for this nucleolar protein. Furthermore, it was detected by silver staining as it is an Ag-NOR (silver stained-Nucleolar Organizer Region) protein (Goodpasture and Bloom, 1975; Fernandez-Gomez et al., 1983; Roussel et al., 1992). Interestingly, Ag-staining is observed in NORs displaying secondary constrictions (transcriptionally active) but not in NOR lacking these constrictions (transcriptionally inactive) (Hernandez-Verdun et al., 1982; Lacadena et al., 1984; Haasen et al., 1999). Thus, this early work indicated functional interaction of nucleolin with active rDNA chromatin. Likewise, since its discovery, several publications have shown that nucleolin might

play a dual role in rDNA gene expression. Indeed, nucleolin protein seems to have both positive and negative effects on rDNA transcription and/or pre-rRNA processing.

## 1.1. Nucleolin a phylogenetically conserved protein gene

Nucleolin genes are found in all animal, yeast and plant species (Ginisty et al., 1999; Gabellini et al., 2002; Tajrishi et al., 2011). Most animal cells, including human (Srivastava and Pollard, 1999), mouse (Bourbon et al., 1988) and hamster (Lapeyre et al., 1986) contain one nucleolin gene per haploid genome. However, tetraploid species like *Cyprinus carpio* (Quezada et al., 2006) or *Xenopus laevis* (Messmer and Dreyer, 1993) contain up to three nucleolin genes. Yeast cells also have a single nucleolin protein gene: *NSR1* (Nuclear Signal Recognition) in *Saccharomyces cerevisiae* and *GAR2* (glycine–arginine-rich 2) in *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo and Inouye, 1992; Gulli et al., 1995). In contrast, the genomes of plant species contain at least two nucleolin protein genes. These include monocotyledonous and dicotyledonous plants like rice, sorghum, maize, poplar and *Arabidopsis thaliana* (Saez-Vasquez and Medina, 2008; Tajrishi et al., 2011).

The structure of nucleolin proteins has been highly conserved during evolution; it contains three domains with similar arrangements in yeast, plants and animals (Fig. 1). The N-terminal or acidic domain, the central domain or RNA Recognition Motifs (RRMs) and the C-terminal or glycine/arginine-rich domain (GAR/RGG). The N-terminal domain has a variable number of acidic stretches among the nucleolin proteins and is involved in protein–protein interactions (Bharti et al., 1996; Edwards et al., 2000). Acidic sequences interact with histone H1 and

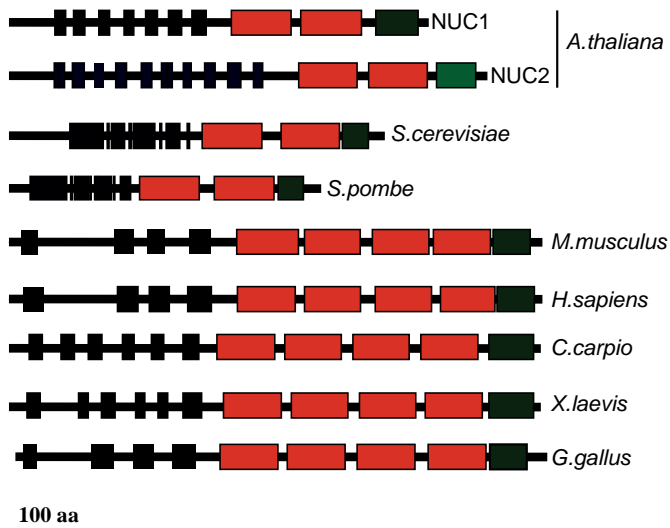
**Abbreviations:** NUC/NCL, nucleolin; RNAPI, RNA polymerase I; NSR1, Nuclear Signal Recognition 1; GAR, glycine–arginine-rich; RGG, Arg-Gly-Gly repeats; RRM, RNA Recognition Motifs; DFC, dense fibrillar component; FC, fibrillar centers; TIF-1A, Transcription Initiation Factor 1A; CKII, Casein Kinase II; NopA64, Nucleolar Protein A64; UBF, Upstream Binding Factor; snoRNP, small nucleolar RiboNucleoProtein; 5'ETS, 5'-external transcribed spacer; FACT, Facilitates Chromatin Transcription; TTF-1, Transcription Terminator Factor 1; NoRC, Nucleolar Remodelling Complex; HDAC1, histone deacetylase 1; CSB/CSA, Cockayne Syndrome Group B/A; NORs, Nucleolus Organizer Regions.

\* Corresponding author.

E-mail address: [saez@univ-perp.fr](mailto:saez@univ-perp.fr) (J. Sáez-Vásquez).<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.023>

0378-1119/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Durut, N., Sáez-Vásquez, J., Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription, Gene (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.023>



**Fig. 1.** Schematic representation of nucleolin and nucleolin-like protein structures: from *A. thaliana* (NUC1 and NUC2), *Schizosaccharomyces cerevisiae* (NSR1p), *Schizosaccharomyces pombe* (GAR2p), *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Cyprinus carpio*, *Xenopus laevis* and *Gallus gallus*. The blue dark gray boxes correspond to the acidic stretches in the N-terminal domain, the red boxes refer to the RRM motifs, and the green boxes represent the GAR domain. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

induce chromatin decondensation (Erard et al., 1988). The central domain contains two RRM in yeast and plants and four in animals. The RRMs are less conserved within the same protein compared with RRMs from different proteins (Ginisty et al., 1999). The C-terminal domain contains the so-called GAR (glycine and arginine-rich) or RGG (Arg-Gly-Gly repeats) domain. The GAR/RGG sequence is not well conserved across evolution (Ginisty et al., 1999; Tajrishi et al., 2011). Noteworthy, in *Arabidopsis* the potential NUC2-GAR domain is much less well conserved than the NUC1-GAR domain compared with the nucleolin GAR domains from other species (Pontvianne et al., 2007).

The GAR domain is important for binding nucleic acids, nucleolar localization, interaction with ribosomal proteins (RPs) and the assembly of pre-ribosomal particles (Ginisty et al., 1999).

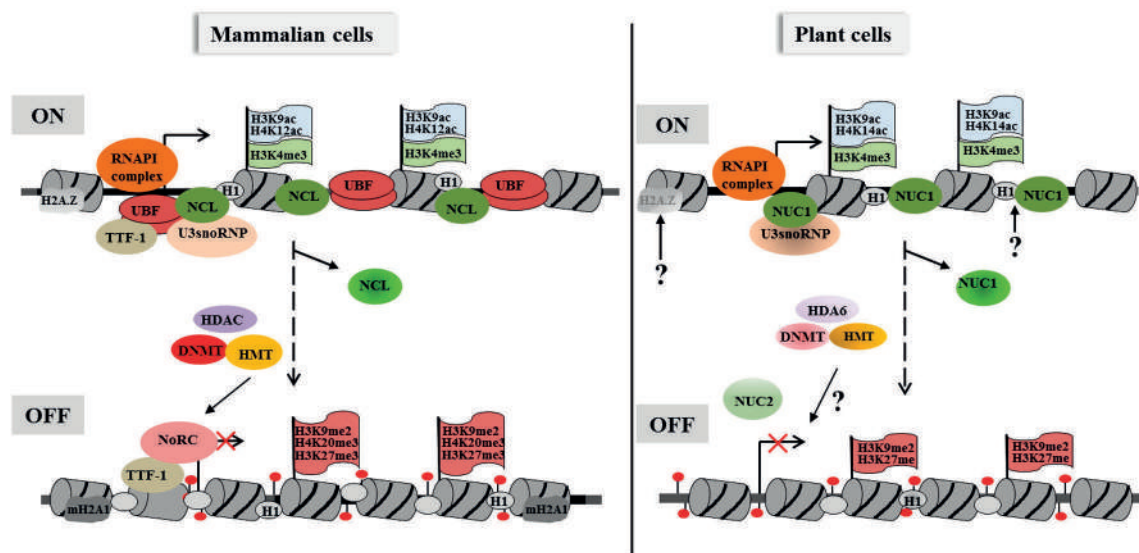
## 2. Nucleolin and rRNA genes

### 2.1. Nucleolar localization of nucleolin

Nucleolin plays a key role in ribosome biogenesis, including transcription and processing of rRNA as well as ribosome assembly and intercellular transport. The localization and distribution of nucleolin in the different nucleolar compartments are linked to the different processes taking place in the nucleolus (Ginisty et al., 1999; Srivastava and Pollard, 1999; Tajrishi et al., 2011). In yeast, plant and animal cells, pre-rRNA transcription takes place at the junction between fibrillar centers (FC) and dense fibrillar component (DFC) where RNAPI and other specific transcription factors associate to form the RNAPI pre-initiation complex at rDNA promoter (Grummt, 2003; Raska, 2003). In agreement with a role in rDNA expression, nucleolin from vertebrates and yeast predominantly localizes in the junction of FC/DFC and in the DFC compartment (reviewed in Ginisty et al., 1999). Conversely, inhibition of RNAPI transcription induces nucleolin delocalization from DFC (Escande et al., 1985). Similarly, nucleolin from *Arabidopsis* and other plants is present in DFC around FCs (de Carcer and Medina, 1999; Pontvianne et al., 2007; Stepinski, 2009).

### 2.2. Nucleolin regulates RNAPI transcription

Early studies suggested that nucleolin protein could play a repressive role in RNAPI transcription. It was shown that injection of nucleolin antisense RNA leads to enhanced rRNA transcription about 2–3.5 fold in *Chironomus tentans* glands (Egyhazi et al., 1988) while injection of a 2–4 fold excess of nucleolin in *X. laevis* stage IV oocytes negatively affects accumulation of pre-rRNAs (Roger et al., 2002). However, inhibition of nucleolin gene expression in vivo, instead of microinjecting nucleolin protein into oocytes, provokes contradictory effects. Indeed,



**Fig. 2.** Comparison of models for nucleolin in rRNA genes transcribed by RNA pol I (RNAPI) in mammals and plant cells. rDNA exists in two functional states. At active genes (ON), the promoter is hypomethylated and histones possess euchromatic marks such as acetylated histones H3, H4 and tri-methylation of histone H3 (H3K4me3). At silent genes (OFF), the promoter is hypermethylated and histones possess heterochromatic marks such as di-methylation (H3K9me2) and mono-methylation (H3K27) and/or tri-methylation of histone H3 (H3K27) and H4 (H4K20). Nucleosomes containing histone variant H2A.Z localize near to promoters in mammals and likely in plants. Nucleolin protein (NCL in mammals and NUC1 in plants) associates with transcriptionally active rDNA units, binds H1 and interacts with the U3snoRNP complex. In mammalian cells, nucleolin blocks TTF-1 rDNA binding and its interaction with repressive chromatin remodeler complex NoRC. Decreased amounts of NCL allow TTF-1 and NoRC interaction and recruitment of DNA methyltransferases (DNMT), histone deacetylases (HDAC) and histone methyltransferases (HMT) for chromatin establishment. Histone variant macroH2A.1 accumulates on silent rDNA nucleosomes. In plants, NUC2 expression is up-regulated in the absence of NUC1 and is associated with rDNA heterochromatin establishment during seedling development. The molecular mechanism linking NUCs with plant remodeler complexes, DNA and histone modification activities remains unknown.

partial knock-down of nucleolin by RNAi or by interrupting the nucleolin gene sequence with a T-DNA sequence, revealed an RNAPI transcription activator role of nucleolin in animal and plant cells rather than a repressor role.

First, conditional knockout and RNA interference experiments allowed the demonstration that decreased nucleolin gene expression induces inhibition of RNAPI transcription and provokes modification of nucleolus structure and organization in mammalian and chicken cells, i.e. reduced nucleolus size and segregation of nucleolar components (Ma et al., 2007; Rickards et al., 2007; Storck et al., 2007; Ugrinova et al., 2007). The extent of reduction of RNAPI transcription is correlated with the level of nucleolin knock-down (Rickards et al., 2007). Additionally, the effects on nucleolus structure are similar to those observed after inactivation of RNAPI by actinomycin D (Puvion-Dutilleul et al., 1992) or inhibition of TIF-IA factor (Yuan et al., 2005).

In agreement with an RNAPI activator role, overexpression of nucleolin in HeLa cells leads to increased rDNA transcription (Cong et al., 2012).

It is worth mentioning that inactivation of nucleolin, either by siRNA or conditional knockout, affects cell growth and proliferation and increases apoptosis (Ugrinova et al., 2007; Storck et al., 2009). The null mutation of the *NSR1* or *GAR2* in yeast is not lethal, but causes severe growth defects (Lee et al., 1992; Gulli et al., 1995). Knockout of *NSR1* or *GAR2* leads also to accumulation of 35S pre-rRNA and induces nucleolus reorganization (Leger-Silvestre et al., 1997).

In plants, knockout of the nucleolin gene *NUC1* by a T-DNA insertion provokes growth and developmental defects in *Arabidopsis* (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). In contrast, knockout of the second nucleolin gene (*NUC2*) induces only flowering delay (Durut et al., 2014). Interestingly, in both mutant plants, rRNA gene expression is deregulated, but only *NUC1* mutation affects nucleolus shape and structure. In *nuc1* mutant plants, nucleolin activity is not completely depleted. Indeed, the *NUC2* gene is up-regulated and likely able to rescue, at least partially, the lack of *NUC1* (Pontvianne et al., 2007, 2010). In agreement, disruption of the two nucleolin genes is lethal indicating that expression of nucleolin gene is essential for plant survival (Durut et al., 2014).

### 2.3. Nucleolin and rRNA gene expression

Nucleolin over-expression in highly proliferative cells, including cancerous cells, can be linked to high rRNA synthesis (Srivastava and Pollard, 1999; Abdelmohsen and Gorospe, 2012). Similarly, a correlation of increased nucleolin-like protein expression with the cell cycle and cell proliferation has also been demonstrated in plants (Bogre et al., 1996; Reichler et al., 2001; Gonzalez-Camacho and Medina, 2006). During seed germination, a stage characterized by its fast growth, reactivation of rDNA transcription and pre-rRNA processing is observed in concomitance with up-regulation of nucleolin (Villa-Hernandez et al., 2013). Higher rRNA gene expression during seed germination is associated with rDNA chromatin decondensation and acetylation of rRNA gene promoter (Earley et al., 2010; Zhang et al., 2012).

In contrast, during development or in response to environmental conditions, up-regulation of nucleolin gene expression might repress rDNA transcription. In cold acclimated carp an increased amount of nucleolin inhibits rDNA transcription concomitant with nucleolus segregation (Alvarez et al., 2003). Down-regulation of rDNA transcription might function as a strategy to maintain cellular homeostasis under stress conditions, as it limits energy consumption in disadvantageous conditions. Similarly, induced expression of *NUC2* gene in *Arabidopsis* is associated with repression of specific rRNA genes during developmental transitions (Durut et al., 2014). Interestingly, *Arabidopsis* and carp encode at least two distinct nucleolin proteins and differential expression of specific nucleolin forms might be required for repression of rRNA expression.

The cellular amount of nucleolin seems not to be sufficient to up- or down-regulate rRNA gene expression. Indeed, phosphorylation (Tajrishi et al., 2011), glycosylation (Carpantier 2005), methylation (Pellari and DiMario, 2003) and acetylation (Das et al., 2013) might negatively or positively control nucleolar localization and multiple activities of nucleolin. Therefore, we can expect that cellular, developmental and/or environmental conditions may induce post-translational modifications of nucleolin and modify rDNA gene expression.

### 2.4. Nucleolin in coupling RNA pol I transcription and processing of pre-rRNA

Nucleolin activity is not restricted to rDNA transcription. Thirty years ago, a model was proposed in which nucleolin may form a bridge between chromatin and nascent pre-rRNA transcripts provoking blockage of transcription. Phosphorylation of nucleolin might induce protein cleavage, probably required to release transcription and association of protein products with nascent pre-rRNA transcripts (Bouche et al., 1984). Although the biological significance of nucleolin phosphorylation/proteolysis is still controversial, nucleolin protein is certainly implicated in molecular mechanisms linking rDNA transcription and pre-rRNA processing. Besides, the identification of CKII activity associated with RNAPI holoenzymes (Albert et al., 1999; Saez-Vasquez et al., 2001) suggests that translocation of nucleolin from rDNA to pre-rRNA may be regulated by CKII phosphorylation.

The existing data also show that nucleolin protein interacts with the U3 snoRNP (Saez-Vasquez et al., 2004a, b; Turner et al., 2009). The U3 snoRNP complex binds the 5'-external transcribed spacer (5'ETS) of nascent pre-rRNA and is involved in the coordination of transcription and early pre-rRNA (Granneman and Baserga, 2005). Nucleolin protein also interacts with pre-rRNA specifically through its RRM motif and is required for the first step of pre-rRNA processing in the 5'ETS (Allain et al., 2000; Ginisty et al., 2000). Furthermore, in vitro studies have demonstrated that nucleolin is required for pre-rRNA processing in mouse S100 cell extract and that processing activation is dependent on U3snoRNA (Ginisty et al., 1998).

In plants, early in the nineties it was shown that the nucleolin-like protein NopA64 co-localizes with immune-related UBF and fibrillarin proteins in the DFC surrounding the FC of the nucleolus (Cerdido and Medina, 1995). UBF is required for rRNA transcription initiation (Sanij et al., 2008) whereas fibrillarin associates with box C/D small nucleolar RNA (snoRNA) including U3 (Barneche et al., 2000). This observation provided early evidence of a role for nucleolin in controlling both pre-rRNA transcription and processing. Later, it was demonstrated that nucleolin associates with the U3 snoRNP complex, isolated from cauliflower (Saez-Vasquez et al., 2004a; Samaha et al., 2010). Furthermore, it was shown that the nucleolin-U3snoRNP complex binds rDNA (Caparros-Ruiz et al., 1997) and cleaves pre-rRNA specifically at the primary cleavage site located in the 5'ETS (Saez-Vasquez et al., 2004a).

Interestingly, it was recently shown that Nop1/fibrillarin is able to methylate glutamine of histone H2A. Glutamine methylation is restricted to 35S rDNA unit and is required for binding of the histone chaperone FACT (Tessarz et al., 2014). Fibrillarin is a core protein of the U3snoRNP and subsequently might be required to facilitate histone chaperone activity and chromatin related activities of nucleolin. Binding of the U3snoRNP complex to 5'ETS rDNA could affect the glutamine methylation state of histone H2A and consequently a functional interaction of nucleolin with the histone core. Nucleolin is able to induce remodeling of nucleosomes containing specific histone variants (see below). It is thus possible that histone modification might also affect the FACT-like activity of nucleolin. Alternatively, glutamine methylation of histone H2A could be required either for nucleolin interaction with rDNA or to induce translocation of nucleolin during transcription.

## 2.5. Nucleolin and rDNA chromatin

Early studies demonstrated that nucleolin is able to bind DNA sequences (Olson et al., 1983; Bouche et al., 1984; Sapp et al., 1986) and chromatin (Olson and Thompson, 1983) and to interact with histone H1 to induce chromatin decondensation (Erard et al., 1988; Kharrat et al., 1991). Recently, it was shown that nucleolin possesses H2A/H2B histone chaperone and chromatin related activities (Gaume et al., 2011; Goldstein et al., 2013). A functional interaction between nucleolin and rDNA chromatin was first reported using an in vitro system showing that nucleolin allows RNAPII transcription of chromatin templates (Rickards et al., 2007). This observation is linked to results demonstrating that nucleolin possesses FACT-like activity (Angelov et al., 2006) and that the FACT complex is important for chromatin transcription by RNAPII (Birch et al., 2009). Nucleolin is also able to induce remodeling by SWI/SNF of nucleosome containing the macroH2A1, but not H2A<sub>bd</sub> histone variant (Angelov et al., 2006). Histone variant macroH2A1 is present on methylated rDNA promoter and is correlated with rRNA transcription repression. Nucleolin depletion induces nucleolar relocalization and recruitment of macroH2A1 on the rDNA (Cong et al., 2014).

Positioning of histone variant H2A.Z also seems to play a role in rDNA organization. For instance H2A.Z near the rDNA promoter is associated with rRNA gene activation in mammalian cells (Nemeth et al., 2008; van de Nobelen et al., 2010). Deposition of H2A.Z on rDNA is associated to higher transcriptional activity of rRNA gene in carp cells (Simonet et al., 2013). To our knowledge, nucleolin has not yet been implicated directly in H2A.Z positioning. However, the H2A.Z-chaperone activity of the FACT complex has been reported (Mahapatra et al., 2011). Thus, it is reasonable to propose that FACT-like activity of nucleolin might contribute to positioning or removal of H2A.Z from rDNA.

Plants do not encode macroH2A1 histone variants. However the H2A.Z histone variant seems to play a major role in controlling gene expression during plant development and in response to stress conditions (Kadonaga and Tjian, 1986; Raisner et al., 2005; Kumar and Wigge, 2010). A functional link between plant H2A.Z and nucleolin can be expected since nucleolin and rRNA gene expression profile are linked during plant development and stress conditions (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Stepinski, 2012; Durut et al., 2014).

Epigenetics plays a key role in the establishment of active and inactive rDNA chromatin. For instance, CG methylation of the rDNA and dimethylation of histone at lysine 9 (H3K9me<sub>2</sub>) and mono- and trimethylation of lysine 27 (H3K27me<sub>2</sub> and H3K27me<sub>3</sub>) are associated with transcriptionally silent genes whereas histone H3 acetylation and tri-methylation of lysine 4 (H3K4me<sub>3</sub>) is associated with active genes (Grummt and Pikaard, 2003; Pontvianne et al., 2012). Interestingly, nucleolin interacts with H3 tails and might facilitate transcription through nucleosomes (Heo et al., 2007).

Nucleolin is functionally associated with RNAPII transcription and can be linked to active epigenetic marks. Indeed, decreased amounts of nucleolin in HeLa cells induce increased H3K9me<sub>2</sub> and reduced H4K12 and H3K4me<sub>3</sub> marks in rRNA genes. Nevertheless a reduced amount of nucleolin does not affect rDNA methylation (Cong et al., 2012). Furthermore, depletion of nucleolin induces accumulation of RNAPII at the beginning of the transcribed unit and reduction of the amount of UBF along the promoter and transcribed rDNA sequences. In contrast TTF-1 binding increases with a concomitant slight accumulation of NoRC and HDAC1 factors (Cong et al., 2012). Thus, interaction of nucleolin with chromatin might block recruitment of repressive chromatin complex NoRC (Santoro and Grummt, 2005) and other activities affecting epigenetic histone marks and/or histone variant deposition/positioning.

The role of nucleolin in rDNA chromatin dynamics has also been studied in the model plant *A. thaliana* (Pontvianne et al., 2007, 2010; Durut et al., 2014). It was observed that knockout of the gene *NUC1*

induces rDNA VAR1 expression which is normally silenced in wild type plants (Pontvianne et al., 2010; Abou-Ellail et al., 2011). Moreover, increased rDNA transcription is accompanied by a higher amount of RNAPII associated with the promoter and coding region. It was also observed that the 5'ETS rDNA is demethylated but histone epigenetic marks are not affected in the *nuc1* mutant plants (Pontvianne et al., 2010). Likewise, knockout of the *NUC2* gene also provokes expression of rDNA VAR1; but in contrast to *NUC1* knockout plants, the 5'ETS of rDNA is hypermethylated (Durut et al., 2014). It is not clear how *NUC1* and *NUC2* antagonistically affect rDNA methylation and expression of rDNA VAR1. Nevertheless, DNA hypomethylation in *nuc1* plants was correlated with rDNA chromatin decondensation while hypermethylation in *nuc2* plants is associated with changes in the proportion of rRNA gene variants but not rDNA decondensation. Thus nucleolin loss-function seems to trigger major changes in rDNA chromatin spatial organization, expression and trans-generational stability in plants.

Finally, it was shown that both *NUC1* and *NUC2* bind chromatin. However only *NUC1* is able to assist remodeling of nucleosome in vitro (Durut et al., 2014). Because of the antagonistic activities of *NUC1* and *NUC2*, it would be reasonable to speculate that *NUC1* and *NUC2* interact with rDNA and might inhibit/facilitate the recruitment of activator or repressor chromatin remodeling complexes. To our knowledge, NoRC or CSB/CSA (Yuan et al., 2007; Koch et al., 2014) that negatively or positively controls rRNA gene expression in animals has not been reported in plants. Thus many questions remain open concerning the impact of *NUC1* and *NUC2* on rDNA chromatin dynamics and interactions with specific histone variants and chromatin remodeler complexes.

## 3. Final conclusion

Eukaryotic cells contain hundreds or thousands of copies of 45S rRNA genes localized in Nucleolus Organizer Regions (NORs). However, only a small proportion of these genes is transcriptionally active or competent for RNAPII transcription. Nucleolin protein is associated with active genes and required for rRNA transcription. However, the molecular mechanisms directing the functional interaction of nucleolin with rDNA chromatin competent for transcription are not yet fully understood.

Transcriptionally competent rRNA genes switching from ON to OFF states depend on cellular conditions. Controlling nucleolin gene expression (and/or modifications) and association with rDNA chromatin is expected to play a role in recruitment of chromatin remodeler activities that might activate or repress RNAPII transcription. Plant and mammalian nucleolins seem to affect rDNA chromatin organization in different ways, either at the DNA methylation level or by modifying histone methylation marks respectively. Thus, it would be important to investigate mutual dependency and/or crosstalk between nucleolin and DNA/histone modification pathways (Fig. 2).

Furthermore, it is important to note that transcription of rDNA is linked to pre-rRNA processing. In other words, changes in pre-rRNA processing could affect rDNA transcription. On chromatin, nucleolin might “point to” transcriptionally active genes and/or assist RNAPII transcription, whereas interaction of nucleolin with pre-rRNA might be required for suitable RNA folding and/or processing. Accordingly, it is difficult to conclude on a hierarchical impact of nucleolin in rDNA chromatin organization and processing of rRNA in vivo. A substantial effort should be engaged to address this long standing question.

Finally, it is significant to recall that a single nucleolin protein controls rDNA expression in mammalian and yeast cells while two distinct nucleolin proteins with antagonistic activities seem to be implicated in plants. Plants are sessile organisms and the second gene may be a novel mode of nucleolin to control rRNA gene expression under specific plant developmental and environmental conditions. Determining their role in establishing and/or maintaining active or silent rDNA chromatin is the next challenge.

## Acknowledgment

We thank F. Pontvianne for critical reading and R. Cooke for corrections of English. We apologize to our colleagues whose work we did not mention in this review. This work was supported by the CNRS and by a grant ANR SVSE2\_SUBCELIF 087217.

## References

- Abdelmohsen, K., Gorospe, M., 2012. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808.
- Abou-Elail, M., Cooke, R., Saez-Vasquez, J., 2011. Variations in a team: major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* 2.
- Albert, A.C., Denton, M., Kermekchiev, M., Pikaard, C.S., 1999. Histone acetyltransferase and protein kinase activities copurify with a putative *Xenopus* RNA polymerase I holoenzyme self-sufficient for promoter-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 796–806.
- Allain, F.H., Bouvet, P., Dieckmann, T., Feigon, J., 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J.* 19, 6870–6881.
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera, M.I., 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 152–158.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., Bouvet, P., 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* 25, 1669–1679 (Epub 2006 Apr 1666).
- Barneche, F., Steinmetz, F., Echeverria, M., 2000. Fibrillar genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 275, 27212–27220.
- Bharti, A.K., Olson, M.O., Kufe, D.W., Rubin, E.H., 1996. Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 271, 1993–1997.
- Birch, J.L., Tan, B.C., Panov, K.I., Panova, T.B., Andersen, J.S., Owen-Hughes, T.A., Russell, J., Lee, S.C., Zomerjijk, J.C., 2009. FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. *EMBO J.* 28, 854–865.
- Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D.T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E., Hirt, H., 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucM1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* 8, 417–428.
- Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., 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.
- Bourbon, H.M., Lapeyre, B., Amalric, F., 1988. Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *J. Mol. Biol.* 200, 627–638.
- Caparros-Ruiz, D., Lahmy, S., Piersanti, S., 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.
- Carpentier, M., Morelle, W., Coddeville, B., Pons, A., Masson, M., Mazurier, J., Legrand, D., 2005. Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 44, 5804–5815.
- Cerdido, A., Medina, F.J., 1995. Subnucleolar location of fibrillar and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 103, 625–634.
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., Bouvet, P., 2014. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 181–192.
- Cong, R., Das, S., Douet, J., Wong, J., Buschbeck, M., Mongelard, F., Bouvet, P., 2014. MacroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 181–192.
- Das, S., Cong, R., Shandilya, J., Senapati, P., Moindrot, B., Monier, K., Delage, H., Mongelard, F., Kumar, S., Kundu, T.K., Bouvet, P., 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Lett.* 587, 417–424.
- de Carcer, G., Medina, F.J., 1999. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J. Struct. Biol.* 128, 139–151.
- Durut, N., Abou-Elail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., de Bures, A., Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., Merret, R., Echeverria, M., Bouvet, P., Nakamura, K., Saez-Vasquez, J., 2014. A duplicated NUCLEOLIN gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 1330–1344.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., Pikaard, C.S., 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* 24, 1119–1132.
- Edwards, T.K., Saleem, A., Shaman, J.A., Dennis, T., Gerigk, C., Oliveros, E., Gartenberg, M.R., Rubin, E.H., 2000. Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 275, 36181–36188.
- Egyhazi, E., Pigon, A., Chang, J.H., Ghaffari, S.H., Dreesen, T.D., Wellman, S.E., Case, S. T., Olson, M.O., 1988. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus salivary gland* cells. *Exp. Cell Res.* 178, 264–272.
- Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., Amalric, F., 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* 175, 525–530.
- Escande, M.L., Gas, N., Stevens, B.J., 1985. Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biol. Cell.* 53, 99–109.
- Fernandez-Gomez, M.E., Sanchez-Pina, M.A., Risueno, M.C., Medina, F.J., 1983. Differential staining of the nucleolar organizing region (NOR) and nucleolar components by a new silver technique in plants. *Cell. Mol. Biol.* 29, 181–187.
- Gabellini, D., Green, M.R., Tupler, R., 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110, 339–348.
- Gaume, X., Monier, K., Argoul, F., Mongelard, F., Bouvet, P., 2011. In vivo study of the histone chaperone activity of nucleolin by FRAP. *Biochem. Res. Int.* 2011, 187624.
- Ginisty, H., Amalric, F., Bouvet, P., 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 17, 1476–1486.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P., 1999. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112, 761–772.
- Ginisty, H., Serin, G., Ghisolfi-Nieto, L., Roger, B., Libante, V., Amalric, F., Bouvet, P., 2000. Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. *J. Biol. Chem.* 275, 18845–18850.
- Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., Kastan, M.B., 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16874–16879.
- Gonzalez-Camacho, F., Medina, F.J., 2006. 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 (Epub 2005 Oct 2011).
- Goodpasture, C., Bloom, S.E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53, 37–50.
- Granneman, S., Baserga, S.J., 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 281–286.
- Grummt, I., 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* 17, 1691–1702.
- Grummt, I., Pikaard, C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 641–649.
- Gullii, M.P., Girard, J.P., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., 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.
- Haasen, D., Kohler, C., Neuhaus, G., Merkle, T., 1999. Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 695–705.
- Heo, K., Kim, B., Kim, K., Choi, J., Kim, H., Zhan, Y., Ranish, J.A., An, W., 2007. Isolation and characterization of proteins associated with histone H3 tails in vivo. *J. Biol. Chem.* 282, 15476–15483.
- Hernandez-Verdun, D., Derenzini, M., Bouteille, M., 1982. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. *Chromosoma* 85, 461–473.
- Kadonaga, J.T., Tjian, R., 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5889–5893.
- Kharrat, A., Derancourt, J., Doree, M., Amalric, F., Erard, M., 1991. Synergistic effect of histone H1 and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer. *Biochemistry* 30, 10329–10336.
- Koch, S., Garcia Gonzalez, O., Assfalg, R., Schelling, A., Schafer, P., Scharffetter-Kochanek, K., Iben, S., 2014. Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. *Cell Cycle* 13, 2029–2037.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Tabata, S., Saez-Vasquez, J., Echeverria, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S., Nakamura, K., 2007. Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* 49, 1053–1063.
- Kondo, K., Inouye, M., 1992. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267, 16252–16258.
- Kumar, S.V., Wigge, P.A., 2010. H2AZ-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* 140, 136–147.
- Lacadena, J.R., Cermeno, M.C., Orellana, J., Santos, J.L., 1984. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67, 207–213.
- Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S.H., Rao, S.V., Dumar, T.S., Olson, M.O., 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J. Biol. Chem.* 261, 9167–9173.
- Lee, W.C., Zabetakis, D., 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., Gullii, M.P., Noaillic-Depeyre, J., Faubladiere, M., Sicard, H., Caizergues-Ferrer, M., 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.
- Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S., Fukui, K., 2007. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.* 120, 2091–2105.
- Mahapatra, S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A., Bhargava, P., 2011. Yeast H2AZ, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 4023–4034.
- Messmer, B., Dreyer, C., 1993. Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 369–382.

- Nemeth, A., Guibert, S., Tiwari, V.K., Ohlsson, R., Langst, G., 2008. Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *EMBO J.* 27, 1255–1265.
- Olson, M.O., Thompson, B.A., 1983. Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* 22, 3187–3193.
- Olson, M.O., Rivers, Z.M., Thompson, B.A., Kao, W.Y., Case, S.T., 1983. Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 3345–3351.
- Orrick, L.R., Olson, M.O., Busch, H., 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1316–1320.
- Pellar, G.J., DiMario, P.J., 2003. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* 111, 461–469 (Epub 2003 Feb 2026).
- Petricka, J.J., Nelson, T.M., 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* 144, 173–186.
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., Saez-Vasquez, J., 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* 18, 369–379.
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S., Saez-Vasquez, J., 2010. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 6, e1001225.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Feng, W., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., Pikaard, C.S., 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev.* 26, 945–957.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Pichard, E., Bachelier, J.P., Puvion, E., 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 149–162.
- Quezada, C., Navarro, C., San Martin, R., Alvarez, M., Molina, A., Vera, M.I., 2006. Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: evidence for several genes. *Biol. Res.* 39, 353–365.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., Madhani, H.D., 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233–248.
- Raska, I., 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13, 517–525.
- Reichler, S.A., Balk, J., Brown, M.E., Woodruff, K., Clark, G.B., Roux, S.J., 2001. Light differentially regulates cell division and the mRNA abundance of pea nucleolin during deetiolation. *Plant Physiol.* 125, 339–350.
- Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., LeRoy, G., 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell Biol.* 27, 937–948.
- Roger, B., Moisan, A., Amalric, F., 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 (Epub 12001 Dec 10231).
- Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F., Hernandez-Verdun, D., 1992. Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp. Cell Res.* 203, 259–269.
- Saez-Vasquez, J., Medina, F.J., 2008. The plant nucleolus. *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology* vol. 47. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 1–46.
- Saez-Vasquez, J., Meissner, M., Pikaard, C.S., 2001. RNA polymerase I holoenzyme–promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 47, 449–459.
- Saez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., Echeverria, M., 2004a. 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., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., Echeverria, M., 2004b. Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 578–580.
- Samaha, H., Delorme, V., Pontvianne, F., Cooke, R., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Echeverria, M., Saez-Vasquez, J., 2010. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a *Brassica oleracea* RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant J.* 61, 383–398.
- Sanij, E., Poortinga, G., Sharkey, K., Hung, S., Holloway, T.P., Quin, J., Robb, E., Wong, L.H., Thomas, W.G., Stefanovsky, V., Moss, T., Rothblum, L., Hannan, K.M., McArthur, G.A., Pearson, R.B., Hannan, R.D., 2008. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J. Cell Biol.* 183, 1259–1274.
- Santoro, R., 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.
- Sapp, M., Knippers, R., Richter, A., 1986. DNA binding properties of a 110 kDa nucleolar protein. *Nucleic Acids Res.* 14, 6803–6820.
- Simonet, N.G., Reyes, M., Nardocci, G., Molina, A., Alvarez, M., 2013. Epigenetic regulation of the ribosomal cistron seasonally modulates enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in response to different environmental inputs in carp (*Cyprinus carpio*). *Epigenet. Chromatin* 6, 22.
- Srivastava, M., Pollard, H.B., 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911–1922.
- Stepinski, D., 2009. Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* 235, 77–89.
- Stepinski, D., 2012. Nucleolin level in plant root meristematic cells under chilling stress and recovery. *Micron* 43, 870–875.
- Storck, S., Shukla, M., Dimitrov, S., Bouvet, P., 2007. Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell. Biochem.* 41, 125–144.
- Storck, S., Thiry, M., Bouvet, P., 2009. Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol. Cell.* 101, 153–167.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., Tuteja, N., 2011. Nucleolin: the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* 4, 267–275.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., Kouzarides, T., 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.
- Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.L., McStay, B., Watkins, N.J., 2009. A novel SSU processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5 and DBP4. *Mol. Cell Biol.* 30, 30.
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., Bouvet, P., 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8, 66.
- van de Nobelen, S., Rosa-Garrido, M., Leers, J., Heath, H., Soochit, W., Joosen, L., Jonkers, I., Demmers, J., van der Reijden, M., Torrano, V., Grosveld, F., Delgado, M.D., Renkawitz, R., Galjart, N., Sleutels, F., 2010. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenet. Chromatin* 3, 19.
- Villa-Hernandez, J.M., Dinkova, T.D., Aguilar-Caballero, R., Rivera-Cabrera, F., Sanchez de Jimenez, E., Perez-Flores, L.J., 2013. Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie* 95, 1871–1879.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H.J., Schutz, G., Grummt, I., 2005. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 19, 77–87.
- Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., Zhou, Y., 2007. Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol. Cell* 27, 585–595.
- Zhang, L., Hu, Y., Yan, S., Li, H., He, S., Huang, M., Li, L., 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Mol. Biol.* 79, 285–293.



## V- Objectifs de thèse

Chez les eucaryotes, la nucléoline est une protéine multi fonctionnelle impliquée notamment dans la biogenèse des ribosomes et plus particulièrement dans la transcription ARN Pol I. De manière intéressante, contrairement aux animaux et aux levures, le génome des plantes contient deux gènes codant pour les protéines nucléoline. Chez *A. thaliana*, deux gènes de la nucléoline ont été identifiés : *NUC1* et *NUC2*.

L'équipe, au sein de laquelle j'effectue ma thèse, s'intéresse depuis quelques années aux mécanismes impliqués dans la dynamique du nucléole et des gènes ribosomiques. Leurs précédents travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de la protéine NUC1 dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr et leur expression chez *Arabidopsis thaliana* (Pontvianne et al. 2007; Pontvianne et al. 2010). Cependant, la fonction biologique du gène *NUC2* reste encore à déterminer. Plusieurs questions se sont posées concernant la signification biologique de la conservation du deuxième gène chez les plantes. *Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre les protéines NUC1 et NUC2 ou bien de nouvelles fonctions ont-elles été attribuées à la NUC2 au cours de l'évolution ?* Le gène *NUC1* ayant été caractérisé précédemment, je me suis alors intéressée au gène *NUC2* au cours de ma thèse.

Dans ce contexte, mes objectifs ont été :

- D'une part, de déterminer la signification biologique de la protéine NUC2. *Est-ce un gène fonctionnel ? Si oui, quel est son rôle et est-il impliqué dans l'organisation chromatinienne des ADNr comme son homologue NUC1 ?*
- D'autre part, d'étudier le rôle « physiologique » de la NUC2 au sein de la plante. *La conservation de ce deuxième gène est-il une adaptation évolutive des plantes ?*

# Résultats

---

## **Partie I : Implication de la protéine NUC2 dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr 45S chez *A. thaliana*.**

---

Cette première partie est dédiée à la caractérisation fonctionnelle de la protéine NUC2. Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le gène dupliqué *NUC2* est un gène fonctionnel impliqué dans l'organisation des gènes d'ARNr.

Dans un premier temps, nous avons montré que la mutation du gène *NUC2*, par insertion ADN-T, n'affecte pas les premières étapes du développement de la plante, contrairement à son homologue *NUC1*. Seul un léger retard de floraison est observé. En revanche, la double mutation *nuc1nuc2* est létale ce qui souligne l'importance de ces deux protéines pour la survie de la plante.

Par la suite, l'étude des plantes mutantes *nuc2* nous a permis de montrer que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation et l'expression des gènes d'ARNr, mais par des mécanismes antagonistes à ceux décrits pour la NUC1. Les mutants *nuc1* et *nuc2* présentent une accumulation des transcrits *VAR1*, normalement réprimés dans les plantes sauvages adultes. Cependant, contrairement au mutant *nuc1*, l'absence de la NUC2 induit une hyper méthylation des ADNr associée à des variations du nombre de copies des variants d'ADNr suggérant que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation génomique des gènes d'ARNr et donc dans la stabilité du génome. L'ensemble de ces travaux nous ont permis d'établir un modèle dans lequel nous proposons que la protéine NUC2 participe à la formation de l'hétérochromatine dans les premières étapes de développement de la plante.

**A- Article publié dans *Plant Cell***

**“A duplicated Nucleolin gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*”**

# A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in *Arabidopsis*<sup>C|W|O|P|E|N</sup>

Nathalie Durt,<sup>a,b</sup> Mohamed Abou-Ellail,<sup>a,b</sup> Frédéric Pontvianne,<sup>a,b</sup> Sadhan Das,<sup>c</sup> Hisae Kojima,<sup>d</sup> Seiko Ukai,<sup>d</sup> Anne de Bures,<sup>a,b</sup> Pascale Comella,<sup>a,b</sup> Sabine Nidelet,<sup>e</sup> Stéphanie Rialle,<sup>e</sup> Remy Merret,<sup>a,b</sup> Manuel Echeverria,<sup>a,b</sup> Philippe Bouvet,<sup>c</sup> Kenzo Nakamura,<sup>d,1</sup> and Julio Sáez-Vásquez<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5096, 66860 Perpignan, France

<sup>b</sup> Université de Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5096, F-66860 Perpignan, France

<sup>c</sup> École Normale Supérieure Lyon, CNRS, Unité de Service et de Recherche 3010, Lyon 69364, France

<sup>d</sup> Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

<sup>e</sup> Montpellier GenomiX, Montpellier Cedex 5, France

ORCID ID: 0000-0002-2717-7995 (J.S.-V.)

**In plants as well as in animals, hundreds to thousands of 45S rRNA gene copies localize in Nucleolus Organizer Regions (NORs), and the activation or repression of specific sets of rDNA depends on epigenetic mechanisms. Previously, we reported that the *Arabidopsis thaliana* nucleolin protein NUC1, an abundant and evolutionarily conserved nucleolar protein in eukaryotic organisms, is required for maintaining DNA methylation levels and for controlling the expression of specific rDNA variants in *Arabidopsis*. Interestingly, in contrast with animal or yeast cells, plants contain a second nucleolin gene. Here, we report that *Arabidopsis* NUC1 and NUC2 nucleolin genes are both required for plant growth and survival and that NUC2 disruption represses flowering. However, these genes seem to be functionally antagonistic. In contrast with NUC1, disruption of NUC2 induces CG hypermethylation of rDNA and NOR association with the nucleolus. Moreover, NUC2 loss of function triggers major changes in rDNA spatial organization, expression, and transgenerational stability. Our analyses indicate that silencing of specific rRNA genes is mostly determined by the active or repressed state of the NORs and that nucleolin proteins play a key role in the developmental control of this process.**

## INTRODUCTION

In eukaryotes, 45S rDNA (encoding 18S, 5.8S, and 25S rRNA) is arranged in tandem arrays, with copy numbers ranging from hundreds to several thousands in plants. However, only a small proportion of rRNA genes are transcribed. The active fraction forms loops that emanate from knobs of heterochromatin to form the nucleolus (Sáez-Vásquez and Gadal, 2010; Layat et al., 2012; Grummt and Längst, 2013). Although the epigenetic pathways to silence rDNA have largely been studied in *Arabidopsis thaliana* hybrid plants (Lawrence et al., 2004), the mechanisms that activate and/or repress hundreds of rDNA units have not yet been fully elucidated in a nonhybrid plant. Recent reports reveal that proteins involved in histone and DNA modifications might play major roles in the activation and/or

repression of specific subsets of rRNA genes in *Arabidopsis* plants (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2012).

Nucleolin is one of the most abundant nucleolar proteins and is expected to play a major role in the multiple functions of the nucleolus. Moreover, it has been implicated in DNA replication, recombination, and repair (Tuteja and Tuteja, 1998), nucleolar localization of telomerase (Khurts et al., 2004), and chromatin remodeling (Angelov et al., 2006; Mongelard and Bouvet, 2007). However, in contrast with animals and yeast, the genomes of different plant species encode at least two nucleolin-like proteins (Supplemental Figure 1). This suggests that duplicated nucleolin genes might play redundant and/or specific roles during plant growth and development or in response to environmental conditions.

In *Arabidopsis*, two genes encoding nucleolin proteins have been described: NUC1 and NUC2 (formerly named NUC-L1 and NUC-L2). The first is highly and ubiquitously expressed in normal growth conditions (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Knockout mutations of the gene are not lethal but lead to severe defects in plant growth and development (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Moreover, the absence of this protein in *nuc1* (formally named *nuc-L1*) mutant plants induces nucleolar disorganization, Nucleolus Organizer Region (NOR) decondensation, pre-rRNA accumulation (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007), and the derepression of specific 45S

<sup>1</sup> Current address: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

<sup>2</sup> Address correspondence to saez@univ-perp.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Julio Sáez-Vásquez (saez@univ-perp.fr).

Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

Online version contains Web-only data.

Articles can be viewed online without a subscription.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.123893

rDNA variants (Kojima et al., 2007; Pontvianne et al., 2010). By contrast, little is known about NUC2 and its role in rDNA chromatin organization and expression. This led us to investigate more precisely the biological significance of the second nucleolin gene in *Arabidopsis*. We report here that *Arabidopsis* plants require the expression of both *NUC1* and *NUC2* for survival. *NUC1* and *NUC2* both bind chromatin and control rDNA variant expression, but they act through different and antagonistic molecular mechanisms. In *nuc2* loss-of-function plants, rRNA genes are globally hypermethylated, and the copy number of rDNA variants is affected. Finally, the data suggest that delocalization of silent 45S rDNA from inactive to active NORs is able to induce transcriptional activation of normally repressed rRNA genes.

## RESULTS

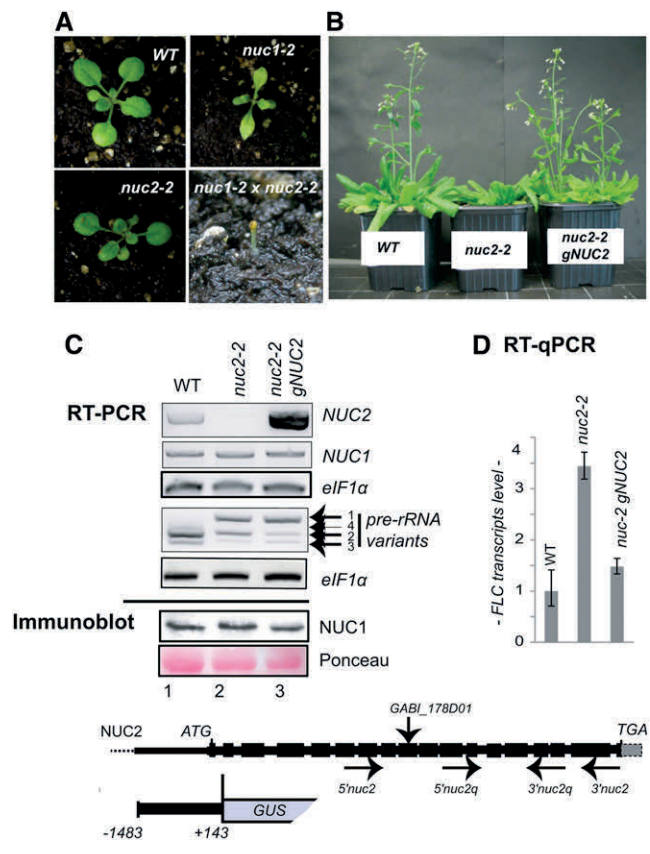
### *NUC2* Is a Functional Protein-Coding Gene

To address the role and biological significance of the second nucleolin gene in plants, we characterized two homozygous *nuc2* mutant lines, inducing partial (*nuc2-1*) or complete (*nuc2-2*) loss of *NUC2* gene expression (Figure 1; Supplemental Figure 2).

Under long-day conditions (16-h day/8-h night), *nuc2-2* mutant seedlings emerge and grow quite similarly to wild-type plants (Figure 1A), while *nuc1* plants display growth defects (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010). We further observed that *nuc1 nuc2* double mutants are not viable (Figure 1A). Indeed, homozygous *nuc1* and *nuc2-2* double mutations are seedling lethal, indicating that *NUC2* is a functional gene and that both nucleolin genes are required for plant survival. Similar results were obtained when the allele *nuc1-3* was introduced into *nuc2-1* mutant plants. We also observed that *nuc1* mutant plants heterozygous for *NUC2* are viable but display stronger growth and developmental defects than homozygous *nuc1* or *nuc2* single mutant plants (Supplemental Figure 3).

Interestingly, *nuc2-2* mutants flower later than wild-type plants (Figure 1B). After 53 d of growth, the wild type displays ~17 flowers per plant, in contrast with ~1 flower per plant for *nuc2-2*. The number of rosette leaves at the time of bolting is ~10 and ~20 in wild-type and *nuc2-2* plants, respectively. We do not observe any obvious floral and/or silique phenotype in *nuc2-2* plants. Late flowering is related to the disruption of the *NUC2* gene, since complementation of *nuc2-2* plants with the *Arabidopsis NUC2* genomic sequence restores wild-type flowering time (Figures 1B and 1C). Moreover, quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses reveal a higher accumulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* transcripts in *nuc2-2* than in wild-type plants (Figure 1D), which is restored in *nuc2-2* plants carrying the *gNUC2* transgene. These observations are further supported by RNA sequencing analysis showing that *FLC* is upregulated in the *nuc2-2* plants. No other genes related to flowering timing or development were detected among the 33 upregulated or 17 downregulated genes in *nuc2-2* compared with wild-type plants (Supplemental Figure 4).

The *Arabidopsis* genome encodes at least four variants of 45S rDNA. While rDNA VAR1 copies are globally transcriptionally



**Figure 1.** *Arabidopsis NUC2* Is a Functional Protein Gene.

(A) Photographs of *Arabidopsis* wild-type, *nuc2-2* (GABI\_178D01), *nuc1-2* (SALK\_002764), and *nuc1 nuc2* plants.

(B) *Arabidopsis* wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants were grown on soil under a 16-h/8-h light/dark cycle. Late flowering is observed in *nuc2-2* mutants compared with wild-type and *nuc2-2 gNUC2* plants.

(C) Top panel, RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old wild-type (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), and *nuc2-2 gNUC2* (lane 3) seedlings to detect *NUC2*, *NUC1*, and 3' ETS pre-rRNA transcripts, respectively. Amplification of *eIF1α* transcripts was performed to verify similar amounts of cDNA in each sample. Bottom panel, immunoblot reaction using  $\alpha$ -At-*NUC1*. The membrane was stained with Ponceau S before hybridization to verify similar amounts of proteins.

(D) RT-qPCR analysis to determine relative levels of *FLC* transcripts in wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants. The drawing at bottom shows the *Arabidopsis NUC2* gene from the ATG start codon to the TGA stop codon. Black boxes correspond to exons separated by introns. The positions of primers 5'*nuc2*/3'*nuc2* and 5'*nuc2q*/3'*nuc2q* used in RT-PCR experiments are shown. A sequence upstream from ATG (nucleotide 1483), the first intron, and the exon from the *NUC2* gene fused to GUS are represented. The positions of primers 5'*nuc1*/3'*nuc1* and rRNA 5'*3ets*/3'*3ets* are shown in Figure 4 and Supplemental Figure 3. The T-DNA insertion in the *nuc2-2* mutant plant GABI\_178D01 is indicated.

[See online article for color version of this figure.]

inactive, rDNA VAR2, VAR3, and VAR4 units are permissive to transcription in adult plants (Pontvianne et al., 2010; Abou-Elail et al., 2011). Disruption of the *NUC1* gene induces the derepression of rDNA VAR1 copies (Pontvianne et al., 2010). Interestingly, strong accumulation of pre-rRNA VAR1 and a decrease of pre-rRNA VAR2 and VAR3 levels are observed in *nuc2-2* mutant

plants (Figure 1C). Wild-type profiles of VAR1 and VAR2 pre-rRNA are not restored to the wild-type level in the *nuc2-2* plants complemented with the *gNUC2* construct. By contrast, we do not detect major differences between the level of *NUC1* transcripts or protein in *nuc2-2* or *nuc2-2 gNUC2* plants compared with wild-type plants.

Thus, the results described above show that *NUC2* is a functional gene that influences flowering time and rRNA gene expression, two phenotypes that appear to be uncoupled.

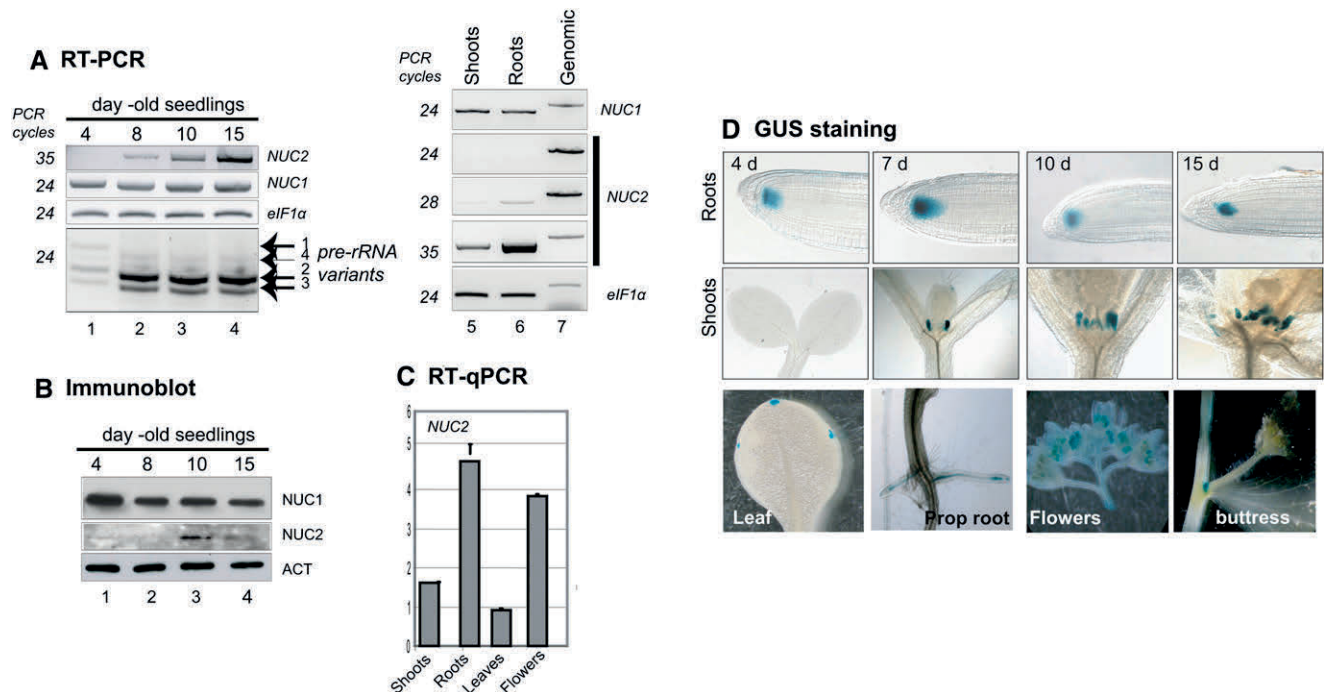
### ***NUC2* Promoter Activity in Specific Plant Tissues and Organs**

Database analyses using Genevestigator ([www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/)) and BAR ([www.bar.utoronto.ca/welcome.htm](http://www.bar.utoronto.ca/welcome.htm)) allow the identification of major fluctuations in the levels of *NUC2* transcripts among different plant tissues, organs, developmental stages, and/or environmental conditions (Figure 2; Supplemental Figure 5). RT-PCR analyses confirm that *NUC2* transcripts are detectable 8 d after germination and then accumulate at 10 and 15 d. A peak of *NUC2* protein accumulation is also detected at 10 d. Interestingly, a concomitant decrease of the pre-rRNA VAR1 level is observed 8 d after germination. By contrast, the levels of

*NUC1* transcript and protein remain similar from 4 to 15 d after germination and accumulate at similar levels in both roots and shoots (Figures 2A and 2B). In adult plants, we observed that the *NUC2* transcript level is higher in roots and flowers than in shoots and leaves (Figures 2A and 2C).

To gain insight into the developmental control of *NUC2* gene expression, we further characterized *NUC2* promoter activity using plants bearing *pNUC2:GUS* (for  $\beta$ -glucuronidase) transcriptional fusions. In the root apical meristem, GUS staining is detected at 4, 7, 10, and 15 d after germination (Figure 2D, top row). By contrast, staining is detected in stipules only after 7 d of germination and then at 10 and 15 d (Figure 2D, middle row), in agreement with our RT-PCR analyses. In adult plants, expression is detected specifically in leaf hydathode cells, lateral roots, flowers, and the buttress (Figure 2D, bottom row). On the other hand, *NUC2* promoter activity is induced in response to auxin treatment and during silique development, earlier in developing anthers than in developing pistils (Supplemental Figures 6 and 7).

Accordingly, these results show that *NUC2* is developmentally controlled in most plant tissues and organs analyzed. Importantly, *NUC2* expression and protein abundance increase during the establishment of rDNA VAR1 repression throughout seedling development.



**Figure 2.** *NUC2* Gene Expression during Seedling Development and in Plant Organs.

(A) RT-PCR to show *NUC2* and *NUC1* transcripts during seed germination (lanes 1 to 4), in shoots (lane 5), and in roots (lane 6). Absence of genomic contamination in the cDNA samples was verified by amplification of *NUC1*, *NUC2*, and *eIF1α* genomic DNA, which generates higher molecular size bands (lane 7). The number of cycles (24, 28, and 35) of each PCR is indicated.

(B) Immunoblot experiment to determine the levels of *NUC1* and *NUC2* proteins during seed germination.  $\alpha$ -Actin (ACT) was used to verify similar amounts of proteins.

(C) RT-qPCR to determine the relative levels of *NUC2* transcripts in shoots, roots, leaves, and flowers.

(D) Analysis of *NUC2* promoter activity in *Arabidopsis* plants transformed with the *pAtNUC2:GUS* construct. Top and middle rows, *Arabidopsis* seeds were sown on MS medium and maintained for 48 h at 4°C (day 0) and then transferred to room culture, at 22°C under continuous light conditions, for 4, 7, 10, and 15 d. Bottom row, GUS staining in leaf hydathode cells, roots, flowers, and buttress. The *NUC2* gene fused to GUS is represented in Figure 1.

### NUC1 Protein Might Control NUC2 Expression

Disruption of *NUC1* induces *NUC2* overexpression (Pontvianne et al., 2007, 2010). To determine if *NUC1* might control *NUC2* expression at the transcriptional level, we transformed *nuc1* mutant plants with the *pNUC2:GUS* reporter gene construct. As shown in Figure 3A, the *nuc1* mutation considerably strengthens the *pNUC2:GUS* signal and extends *NUC2* promoter activity to the entire seedling (compare with Figure 2D, staining in the stipules and roots). In fact, the *pNUC2:GUS* signal in the *nuc1* background is similar to the *pNUC1:GUS* signal in wild-type plants (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Next, the possibility that *NUC1* protein physically interacts with chromatin at the *NUC2* locus was tested by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using an anti-*NUC1* serum (Figure 3B). In wild-type chromatin, *NUC2* sequences were detected with primer pairs corresponding to the 5' region (lanes 5 and 8) but not with primers matching the upstream intergenic region (lane 2). The 5' end of *NUC2* transcripts maps to the position -87 nucleotides upstream from the ATG translation initiation codon; therefore, *NUC1* likely binds the *NUC2* promoter domain rather than its 5' untranslated region domain. No significant signals were detected in PCR using chromatin incubated with protein A alone (lanes 1, 4, and 7) or using chromatin extracted from *nuc1-2* seedlings and incubated with antibodies against *NUC1* (lanes 1, 2, 4, 5, 7, and 8). These *in vivo* analyses are corroborated by *in vitro* electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing that *NUC1* recombinant protein can bind different regions of *NUC2* promoter DNA indiscriminately. These observations suggest that the specificity of *NUC1* for region -307 to -38 might be conferred by the *NUC2* promoter chromatin structure or by other associated proteins in planta (Supplemental Figure 8A).

In standard growth conditions, a methylation island is detected at the 3' sequence of the *NUC2* gene (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/methylome>). However, no changes of CG methylation are observed in this region or in the promoter sequence in *nuc1* mutants (Supplemental Figure 8B). Nevertheless, *NUC2* is also overexpressed in *met1* mutant plants that exhibit a massive loss of DNA methylation at the 3' sequence (Figure 3C). Therefore, local changes in DNA methylation levels cannot explain *NUC2* overexpression in *nuc1* plants. In addition, analyses of mutants for the RNA-directed DNA methylation pathway and histone deacetylases/acetylases do not reveal changes in the expression of *NUC2* (Supplemental Figure 8C).

To test if *NUC1* might also influence *NUC2* expression at the posttranscriptional level, we measured *NUC2* protein levels in 15-d-old wild-type and mutant plants (Figure 3D). At this stage, *NUC2* protein is detected in the two *nuc1* mutant lines tested (lanes 1 and 2) but not in wild-type (lane 6), *nuc2-2* (lane 3), *nuc2-2 gNUC2* (lane 4), or *met1* (lane 5) plants. Furthermore, overexpression of the *NUC2* gene, under the control of the *NUC1* promoter, does not lead to the accumulation of *NUC2* protein in wild-type plants (data not shown).

Together, these results indicate that *NUC1* is required to inhibit *NUC2* gene expression at the transcriptional level and may also influence the accumulation of *NUC2* protein.

### NUC2 Gene Disruption Affects rDNA Chromatin Organization

Because *NUC2* gene disruption increases VAR1 rDNA expression, we further questioned whether (1) RNA pol I transcription and/or (2) rDNA chromatin states are affected in *nuc2-2* mutant plants. In *nuc1* and *histone deacetylase6 (hda6)* mutant plants, the expression of pre-rRNA VAR1 is associated with rRNA transcription initiated from an intergenic spacer and with rDNA chromatin decondensation (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010).

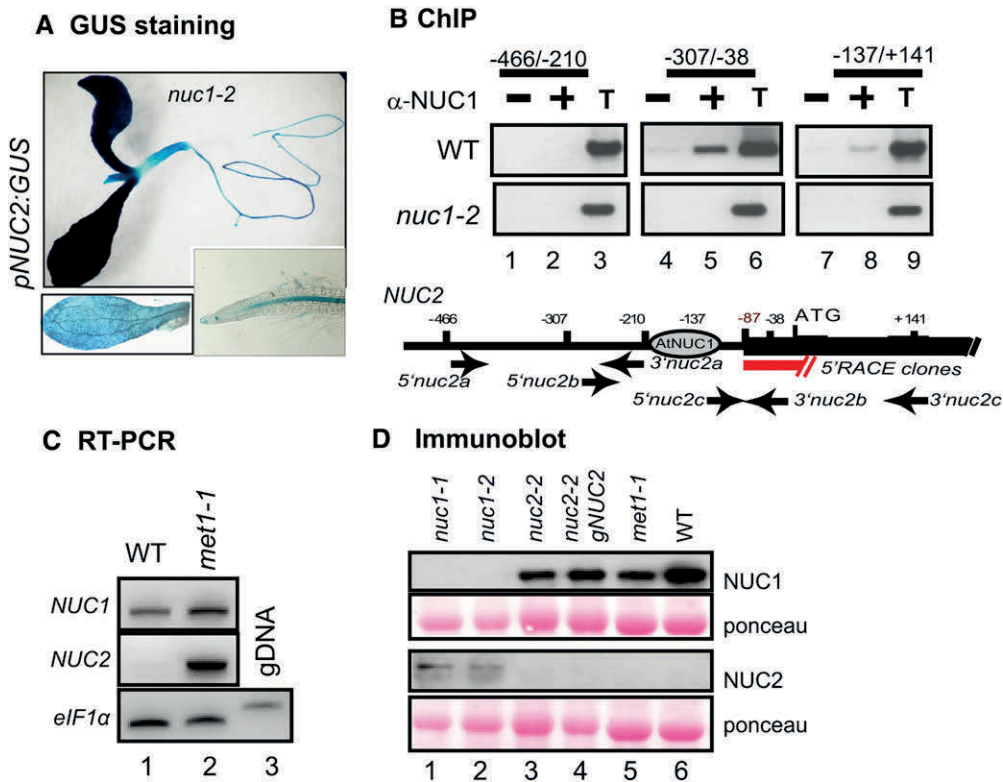
Primer extension analysis (Figure 4A) shows that a single transcription initiation signal (TIS) is detected in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* samples (lanes 2 and 3), in contrast with the double TIS observed in wild-type plants (lane 1). Nevertheless, quantification of the ratio between the TIS corresponding to primary pre-rRNA and the P signal corresponding to short-lived 5' end-cleaved pre-rRNA does not reveal significant changes in the amount of primary or processed rRNA precursors in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* compared with wild-type samples.

To assess whether *NUC2* might influence the expression and subnuclear localization of rDNA, we first tested whether *NUC2* associates with a chromatin fraction. Chromatin samples were notably purified from *nuc1* mutant plants, in which *NUC2* protein overaccumulates, and analyzed by immunoblot. *NUC2* protein was detected in *nuc1* but not in wild-type chromatin samples (Figure 4B). Similarly, the accumulation of *NUC1* protein was detected in wild-type but not in *nuc1* mutant extracts. Based on these results, *NUC2* subnuclear localization was analyzed in more detail by immunofluorescence on fixed cells. This reveals a discrete localization in the nucleolus near large heterochromatin regions corresponding to heavily 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained DNA in the *nuc1* mutant background (Figure 4C; Supplemental Figure 9C). Interestingly, therefore, *NUC2* is mainly concentrated in nucleolar regions physically associated with condensed chromatin regions from which VAR1 rDNA has recently been shown to emanate (Pontvianne et al., 2013). Furthermore, the nucleolar localization of *NUC1* protein is not affected in *nuc2-2* plants (Supplemental Figure 10).

DNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of leaf cells shows that up to four rDNA signals are detected in interphase nuclei of wild-type plants (Figure 4D; Supplemental Table 1). These signals correspond to two each of NOR2 and NOR4 (in chromosomes 2 and 4, respectively), as expected in a diploid *Arabidopsis* cell (Pecinka et al., 2004). Interestingly, ~18% of nucleoli from *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* cells associate with three or more rDNA signals compared with one or two rDNA signals in wild-type nucleoli. By contrast, no significant differences can be detected in the number or size of the centromeres between the DAPI-labeled wild-type and *nuc2-2* and/or *nuc2-2 gNUC2* plants.

Finally, to obtain more insight into how disruption of *NUC2* induces the transcriptional activation of repressed rDNA VAR1, we purified nucleoli from *nuc2-2* mutant plants by fluorescence-assisted nucleolus sorting (FANoS) (Pontvianne et al., 2013). The four rDNA variants are detected in the nuclear fraction from wild-type and *nuc2-2* plants (Figure 4E, lanes 1 and 3). By contrast, in the nucleolar fraction, VAR1 rDNA is enriched in *nuc2-2* samples (lane 4), while only a faint band is detected in wild-type plants (lane 2).





**Figure 3.** NUC1 Participates in the Regulation of *NUC2* Gene Expression.

**(A)** Analysis of *NUC2* promoter activity in *nuc1* mutant plants transformed with the *pNUC2:GUS* construct. The bottom panels show shorter staining to better visualize GUS activity in leaves and roots.

**(B)** Chromatin from wild-type plants was isolated and incubated either with protein A only (lanes 1, 4, and 7) or with antibodies against NUC1 (lanes 2, 5, and 8). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR to detect *NUC2* sequences from  $-466$  to  $-210$  (lanes 1 to 3), from  $-307$  to  $-38$  (lanes 4 to 6), and from  $-137$  to  $+141$  (lanes 7 to 9). The positions of primers used to amplify *NUC2* sequences are indicated. The transcription initiation site is mapped by 5' rapid amplification of cDNA ends at 87 nucleotides upstream from ATG. An aliquot of total chromatin sample before the immunoprecipitation reaction was used to control PCR amplifications (lanes 3, 6, and 9). Chromatin isolated from the *nuc1* mutant was used to control the specificity of At-NUC1 antibodies in the ChIP reaction (*nuc1-2* panels).

**(C)** RT-PCR to show *NUC2* and *NUC1* transcripts in wild-type (lane 1) and *met1-1* (lane 2) plants. The amount of cDNA was verified in each reaction by controlling *eIF1α* transcript levels. Absence of genomic contamination in the cDNA samples was verified by amplification of *eIF1α* genomic DNA, which generates higher molecular size bands (lane 3).

**(D)** Immunoblot analysis to detect NUC1 and NUC2 proteins in *nuc1* (lanes 1 and 2), *nuc2* (lane 3), *nuc2-2 gNUC2* (lane 4), *met1-1* (lane 5), and wild-type (lane 6) plants. Similar amounts of protein in each membrane were verified by Ponceau S staining.

The ratio between rDNA VAR2 and VAR3 signals remains similar in *nuc2-2* (lane 4) compared with the wild-type sample (lane 2).

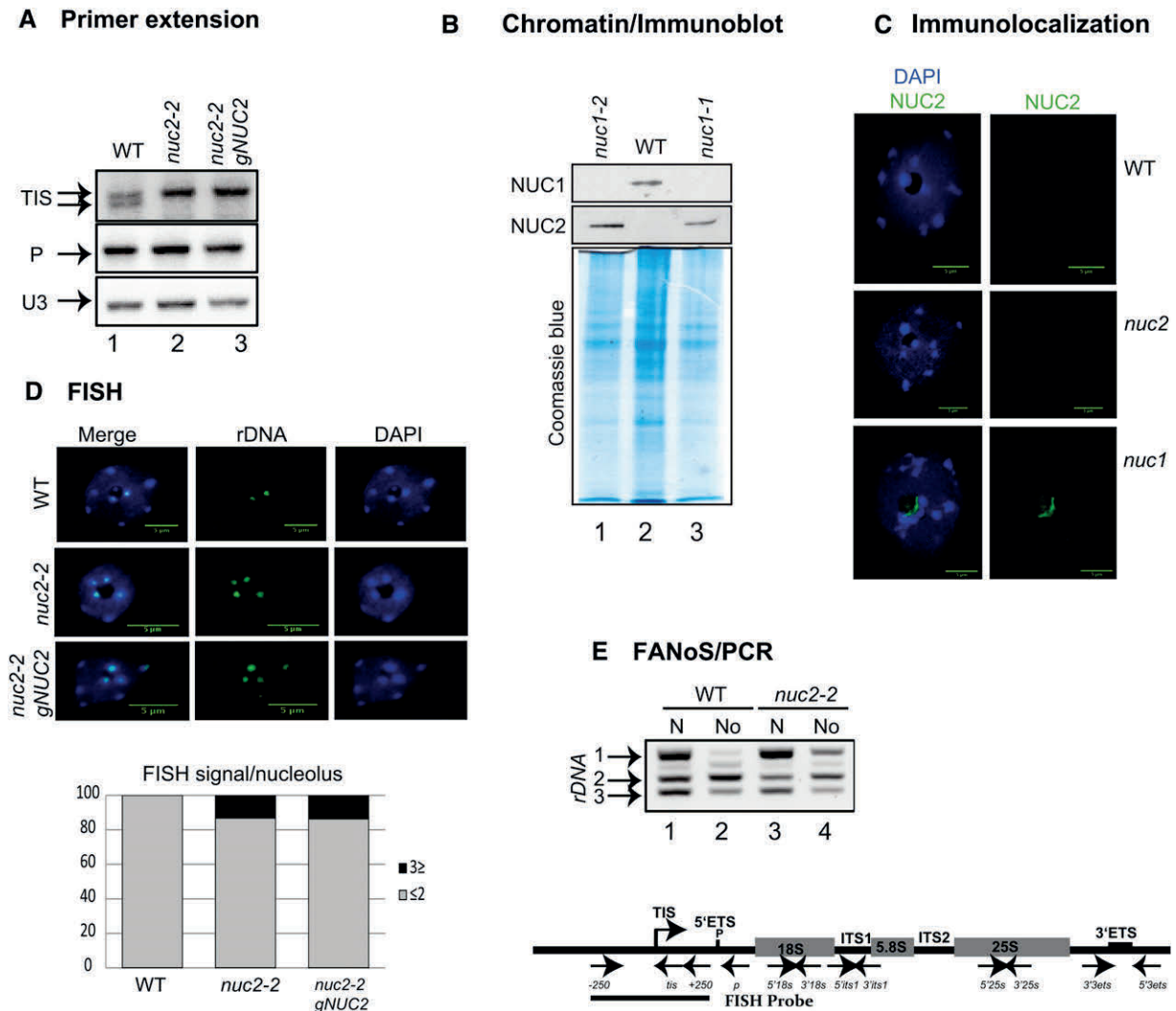
Altogether, these data show that in the *nuc2-2* mutant, rDNA subnuclear localization is altered; rDNA VAR1 is localized and expressed in the nucleolus. These results suggest that some modifications and/or rearrangements of rDNA chromatin occur in *nuc2-2* mutant plants as NUC2 binds chromatin.

#### NUC2 Is Required for the Stability of rDNA Variants Copy Number

Derepression of VAR1 rRNA genes in *nuc2-2* mutant plants could be explained by the observed reorganization of rDNA from inactive to active NOR chromatin (Jakociunas et al., 2013) but also by possible rDNA copy number variation. This phenomenon has previously been observed in *fasciata* (*fas*)

mutant plants (Figure 5A), a subunit of the H3/H4 histone chaperone Chromatin Associated Factor1 complex (Mozgová et al., 2010).

We first quantified 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences in wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants and observed no major variation (Figure 5A, top panel). By contrast, a global decrease of 45S rDNA copy number was detected in *fas2-4* mutant plants, as reported previously (Mozgová et al., 2010). Therefore, we further determined the amount of specific rDNA variants. In this analysis, VAR1, VAR2, and VAR3 rDNA copies represent ~46, 25, and 29%, respectively, of the rRNA genes in wild-type plants. In *nuc2-2* mutants, these numbers showed a relative increase of the VAR1 copy number (~63, 12, and 25%, respectively) (Figure 5B; Supplemental Figure 11). In *nuc2-2 gNUC2* plants, the proportions are similar to the ratio observed in *nuc2-2* mutant plants, indicating that reintroducing the *NUC2*



**Figure 4.** Transcription and rDNA Organization in *nuc2-2* Plants.

(A) Primer extension was performed using total RNA extracted from wild-type (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), and *nuc2-2 gNUC2* (lane 3) plants. Primer *tis* detects transcription from the TIS, and primer *p* detects pre-rRNA precursors cleaved at the primary cleavage site (P) (Sáez-Vasquez et al., 2004; Pontvianne et al., 2007). Primer extension using primer *U3* that accurately maps the 5' end of U3snRNA was used to control similar amounts of total RNA in each reaction.

(B) Immunoblot analysis to detect NUC1 and NUC2 protein in *nuc1* (lanes 1 and 3) and wild-type (lane 2) chromatin extracts. The Coomassie blue gel staining reveals similar amounts of protein in each chromatin sample.

(C) Immunolocalization of NUC2 in leaves from *nuc1* plants. The NUC2 signal (green) colocalizes with chromatin situated in the periphery of the nucleolus and counterstained with DAPI (blue) (*nuc1* panels). No NUC2 signal is detected in wild-type or *nuc2* plants (used here to control the specificity of the antibodies).

(D) FISH analysis with an rDNA probe containing sequences upstream and downstream from TIS (from -250 to +250) reveals the 45S rDNA loci (green) on nuclei from wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants. Counterstaining with DAPI (blue) is shown (FISH and DAPI). The bar graphs at bottom show the percentage of rDNA loci associated with the nucleolus in wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants. Bars = 5  $\mu$ m.

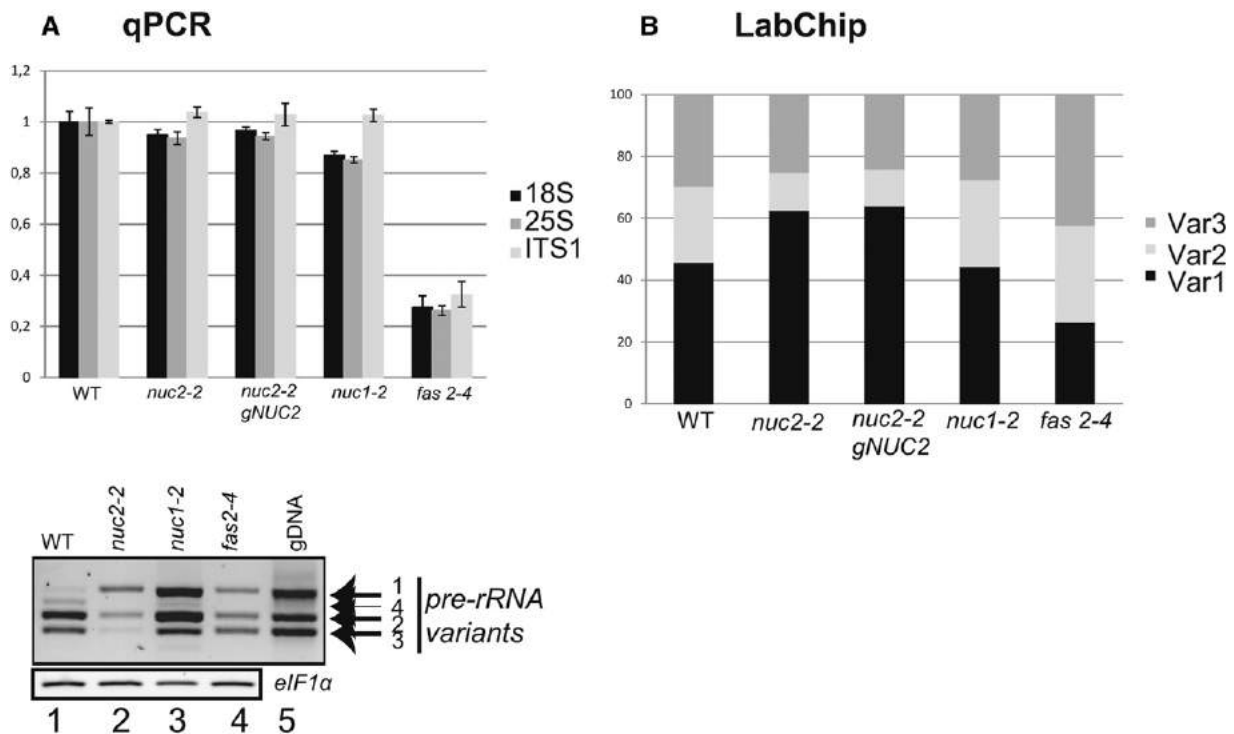
(E) PCR detection of rRNA gene variants in DNA of purified nuclei (N) or nucleoli (No) of wild-type (lanes 1 and 2) and *nuc2-2* (lanes 3 and 4) plants. The positions of *5'3ets* and *3'3ets* primers used in PCR experiments are shown. The scheme at bottom represents the 45S rDNA unit containing the ETS (5' ETS and 3' ETS) and the structural rRNA sequences (18S, 5.8S, and 25S rRNA in gray boxes) separated by internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). Four repeat sequences located in the 3' ETS are represented (R1 to R4). The TIS and the primary cleavage site (P) in the 5' ETS are indicated. The positions of primers used to amplify or detect rRNA genes and/or pre-rRNA sequences are shown.

function did not restore normal rDNA variant copy numbers. In addition, analysis of subsequent *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* generations after five selfings in single-seed descent reveals no further changes in the abundance and expression of rDNA variants (data not shown). Finally, no significant changes are observed in *nuc1-2*, suggesting a specific effect of the loss of *NUC2* function on the stability of the VAR1 copy number.

### rDNA Methylation State in *nuc2-2* Mutants

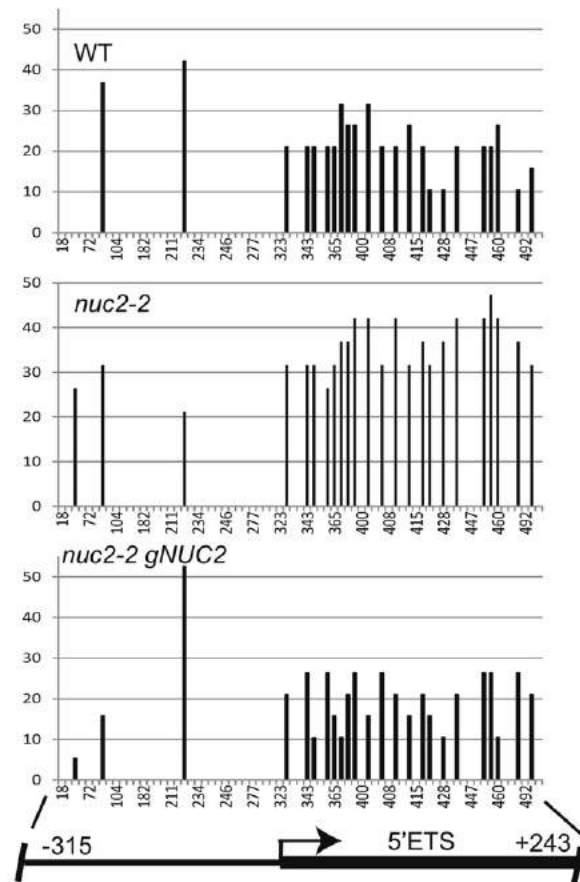
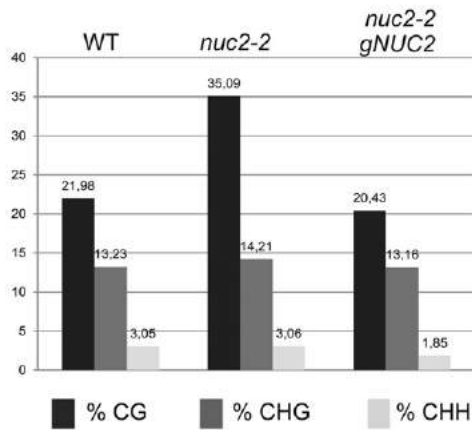
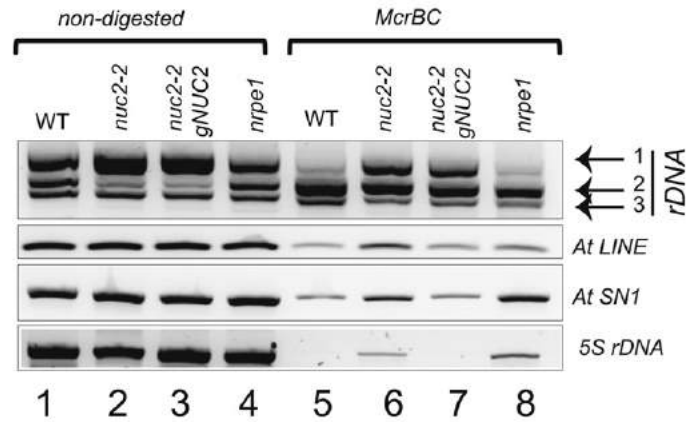
The expression of rRNA VAR1 was recently shown to be associated with CG hypomethylation of the 5' external transcribed spacer (ETS) region in *nuc1* and *hda6* mutant plants (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010). The methylation state of 5' ETS rDNA (from -315 to +243), therefore, was tested by bisulfite sequencing analysis in *nuc2-2*. This reveals a hypermethylated 5' ETS region in *nuc2-2* mutant lines (~35%) compared with wild-type plants (~22%), which was restored to the wild-type level in *nuc2-2 gNUC2* samples. Remarkably, the increased methylation level is restricted to the CG context in the 5' ETS region and is not observed in the upstream promoter domain. CHG and CHH methylation are not affected in *nuc2* plants (Figure 6A).

Because the 5' ETS sequence is shared by all four rDNA variants, bisulfite sequencing does not allow us to determine which rDNA variants are hypermethylated in *nuc2* mutants. Furthermore, bisulfite sequencing of the 3' ETS could not be used because of the higher number of VAR1 copies (Supplemental Figure 12). Consequently, we decided to perform modified cytosine restriction BC (McrBC) PCR restriction analysis, which consists of specifically cleaving methylated DNA and amplifying specific nonmethylated and noncleaved DNA by PCR (Figure 6B; Supplemental Figure 13). This analysis reveals that VAR1 rDNA is highly amplified in both *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* samples (lanes 6 and 7) as compared with wild-type plants (lane 5). This might either result from a global decrease of DNA methylation level on VAR1 rDNA copies or a higher number of unmethylated VAR1 rDNA copies in these plants. By contrast, similar amounts of nonmethylated rDNA VAR2 and VAR3 are detected (lanes 5 to 8). As observed before, a significant reduction of rDNA VAR2 in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants is detected in undigested DNA samples (lanes 2 and 3) compared with control plants (lanes 1 and 4). Only a faint rDNA VAR1 amplification band is detected in wild-type and *nrcp1* plants upon McrBC digestion, revealing that most VAR1 rDNA is methylated in these samples (lanes 5 and 8) (Wierzbicki et al.,



**Figure 5.** The Relative Abundance of rDNA Variants Is Affected in Plants with a Disrupted *NUC2*.

**(A)** Top, quantitative PCR analysis to amplify 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences from wild-type and mutant (*nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, *nuc1-2*, and *fas2-4*) plants. The bar graphs show relative amounts of 18S (black), 25S (dark gray), and ITS1 (gray) rDNA. Bottom, RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old wild-type (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), *nuc1-2* (lane 3), and *fas2-4* (lane 4) seedlings to detect 3' ETS pre-rRNA transcripts. Amplification of *eIF1α* was performed to control similar amounts of cDNA in each sample. PCR on genomic DNA from wild-type plants detects the rDNA variants 1 to 4 (lane 5). **(B)** PCR amplifications of 3' ETS sequences using genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, *nuc1-2*, and *fas2-4* plants. Relative amounts of each rDNA variant were determined using the LabChip GX system. The bar graphs show the percentage of rDNA VAR1 (black), VAR2 (gray), and VAR3 (dark gray).

**A Bisulfite sequencing****B McrBC assay**

**Figure 6.** rDNA Is Hypermethylated in *nuc2-2* Mutant Plants.

**(A)** Bisulfite sequencing analysis. Top, the bar graphs show the percentage of methylated sites in the rRNA gene sequences (from  $-315$  to  $+243$ ) from wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants in CG, CHG, and CHH contexts. Bottom, frequencies at which individual cytosines in a CG context are methylated between  $-315$  and  $+243$  relative to TIS. The scheme shows the positions of rDNA sequences upstream (promoter) and downstream (5' ETS) of TIS. Most of the CG sites localize in the 5' ETS region.

**(B)** Genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, and *nrpe1* plants digested (lanes 5 to 8) or not (lanes 1 to 4) with McrBC. Amplifications of 3' ETS, At LINE, At SN1, and 5S were performed to detect methylated or unmethylated DNA sequences in *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, and control (wild-type and *nrpe1*) plants.

2008). Note that *At LINE* and *At SINE* repeats, as well as 5S rRNA genes, are hypomethylated in *nuc2-2* (lane 6) as in *nrpe1* control plants (lane 8).

Altogether, *NUC2* disruption results in contrasting variations of rDNA methylation at different loci and on different variants, with a significant decrease of methylated DNA levels on 3' ETS VAR1-specific regions.

#### rDNA Organization and Expression in Wild-Type × *nuc2* Plants

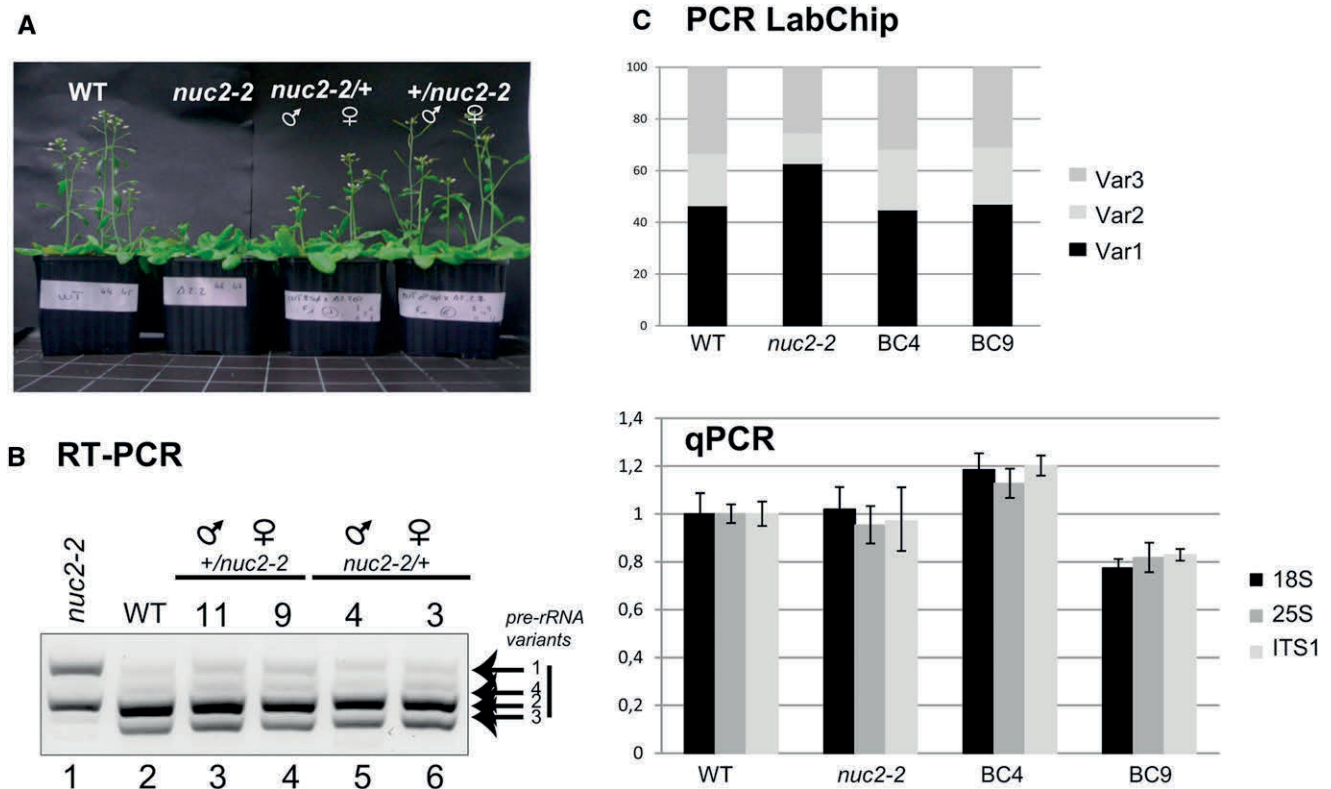
VAR1 rDNA is derepressed in *nuc2* mutant plants, a phenomenon associated with a relative increase of VAR1 copy number in the genome of these plants. Therefore, we determined whether or not the introduction of wild-type rDNA copies could restore normal expression patterns. This was achieved by reciprocally crossing wild-type plants with *nuc2-2* plants (Figure 7). We first observed that F1 plants from backcrossed *nuc2* × wild-type (BC4 and BC3) plants and wild-type × *nuc2* (BC11 and BC9) plants display wild-type flowering timing (Figure 7A). Moreover,

VAR1 pre-rRNA is repressed, while VAR2 and VAR3 expression is restored to wild-type levels in all the backcrossed lines (Figure 7B). The abundance of rDNA VAR1, VAR2, and VAR3 is basically restored to wild-type levels in the backcrossed *nuc2/+* (45, 24, and 31%) and/or *+nuc2* (47, 23, and 30%) plants (Figure 7C, top panel; Supplemental Figure 14). Interestingly, compared with wild-type and *nuc2-2* plants, the amount of rDNA is higher in *+nuc2* (BC9) and lower in *nuc2/+* (BC4) (Figure 7C, bottom panel).

These results suggest that the expression of rDNA VAR1 in *nuc2-2* and in *nuc2-2 gNUC2* plants is intimately linked to changes in the VAR1:VAR2 copies ratio.

#### NUC1 but Not NUC2 Can Assist Nucleosome Remodeling in Vitro

To obtain insight into how the interaction of nucleolin proteins with chromatin might control rDNA organization and/or expression, we studied the nucleosome remodeling of NUC1 and NUC2 in vitro. Mammalian nucleolin has been reported as being



**Figure 7.** Reintegration of Wild-Type rDNA Restores the Abundance of rDNA Variants and the Repression of VAR1 in *nuc2-2*.

(A) Flowering time analysis of wild-type, *nuc2-2*, and backcrossed plants using pollen from *nuc2-2* (*nuc2* × wild type) or from wild-type (wild type × *nuc2*) plants.

(B) RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old *nuc2-2* (lane 1), wild-type (lane 2), *+nuc2* (lanes 3 and 4), and *nuc2/+* (lanes 5 and 6) seedlings to detect 3' ETS pre-rRNA transcripts.

(C) The bar graphs show relative amounts of rDNA VAR1 (black), VAR2 (gray), and VAR3 (dark gray) (top) and 18S (black), 25S (gray), and ITS1 (dark gray) (bottom) rDNA sequences in the wild type, *nuc2-2*, *nuc2/+* (BC4), and *+nuc2* (BC9).

[See online article for color version of this figure.]

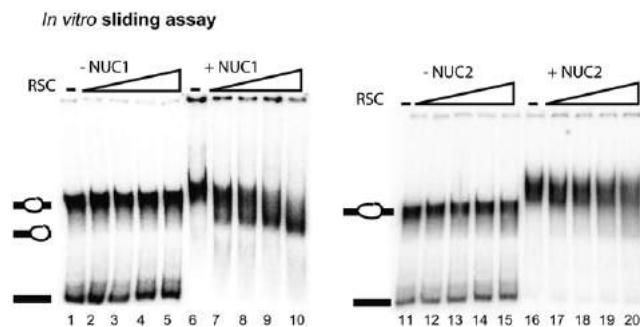
able to bind nucleosomes and assist chromatin-remodeling activities *in vitro* (Angelov et al., 2006; Rickards et al., 2007). To test these potential “activities” of *Arabidopsis* NUC1 and NUC2, we used an *in vitro* nucleosome-sliding assay consisting of nucleosomes assembled *in vitro* and the remodeling activity of chromatin structure remodeling (RSC) (Angelov et al., 2006).

*In vitro*-reconstituted *Xenopus laevis* nucleosomes were incubated with increasing amounts of RSC, resulting in an efficient mobilization of the nucleosomes and the formation of end-positioned nucleosomes (Supplemental Figure 9A). To determine mobilization by NUC1 and NUC2, we used suboptimal RSC concentrations at which RSC was unable to remodel nucleosomes alone (Figure 8). Nucleosomes were further incubated with increasing amounts of RSC in the absence or presence of 300 ng of NUC1 (lanes 1 to 10) or NUC2 recombinant proteins (lanes 11 to 20). As expected, no detectable nucleosome sliding was observed in the absence of NUC1 (lanes 2 to 5) or NUC2 (lanes 12 to 15). By contrast, the presence of NUC1 in the remodeling reaction results in an efficient mobilization of central nucleosomes to end-positioned nucleosomes (lanes 7 to 10). No sliding was observed in the presence of NUC2 (lanes 17 to 20). Incubation of NUC1 or NUC2 proteins with nucleosomes without RSC induces a slight shift (lanes 6 and 16). Note that no free probe is detected in fractions containing nucleolin, presumably due to the strong DNA binding activity of NUC1 and NUC2 proteins (Supplemental Figure 9B). Altogether, these analyses indicate that NUC1 and NUC2 can bind nucleosomes but that only NUC1 can assist nucleosome remodeling *in vitro*.

## DISCUSSION

### *Arabidopsis* NUC2 Is a Functional Protein Gene

The genome of *Arabidopsis*, like most plant genomes, contains two nucleolin protein genes: *NUC1* and *NUC2* (Supplemental Figure 1). Previously, *Arabidopsis* *NUC1* was demonstrated to be



**Figure 8.** NUC1 and NUC2 Binding and Remodeling of Nucleosomes.

Centrally positioned nucleosomes were incubated with increasing (0.2, 0.4, 0.8, and 1.6  $\mu$ L) amounts of RSC in the absence (lanes 2 to 5 and 12 to 15) or presence (lanes 7 to 10 and 17 to 20) of 300 ng of recombinant His-NUC1 or His-NUC2. Lanes 1 and 11 show nucleosomes alone, and lanes 6 and 16 show nucleosomes with 300 ng of His-NUC1 and His-NUC2, respectively. The migrations of centrally positioned nucleosomes, mobilized nucleosomes, and the  $^{32}$ P radioactively end-labeled DNA are indicated on each EMSA gel.

a plant functional homolog of animal and yeast nucleolins (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010). These studies led us to raise the question about the physiological significance of the second nucleolin gene in plants.

*Arabidopsis* *NUC2* knockout plants are viable and do not exhibit a significant growth phenotype, but they have a late flowering phenotype. This suggests that *NUC2* is not an essential gene or that *NUC1* might rescue the function of *NUC2* in *nuc2* mutants. Similarly, *NUC2* at least partially rescues the loss of *NUC1* function in *nuc1* plants (Pontvianne et al., 2007). Accordingly, simultaneous disruption of *NUC1* and *NUC2* is lethal, indicating that *NUC2* can fulfill some essential functions of *NUC1*. Late flowering in *nuc2-2* mutant plants associates with the overexpression of *FLC*, a gene that plays a central role in flowering time regulation in *Arabidopsis* (Crevillén and Dean, 2011). Remarkably, *NUC2* disruption affects the expression of only a small subset of protein-coding and non-protein-coding genes besides *FLC*. No genes related to 45S pre-rRNA transcription or processing are upregulated or downregulated in *nuc2* plants, suggesting that most if not all rDNA phenotypes observed in *nuc2* plants are essentially linked to the absence of *NUC2* (Figures 1 and 4 to 7; Supplemental Figures 4, 11, 13, and 14).

Nucleolin proteins are histone chaperones (Angelov et al., 2006), and, as expected, *NUC1* and *NUC2* are able to bind nucleosomes *in vitro* and are found in chromatin fractions *in vivo* (Figures 4 and 8). The involvement of histone chaperone activities in flowering time has already been reported in plants with disrupted facilitate chromatin transcription complex (FACT) H2A-H2B histone chaperone activity genes (Lolas et al., 2010; Van Lijsebettens and Grasser, 2010). However, in contrast with the *Arabidopsis* *NUC2* gene, the absence of the SSRP1 and SPT16 FACT subunits leads to reduced expression of *FLC* and to early flowering. FACT and nucleolin might have different substrate specificities and act at different genomic positions; therefore, it remains to be determined whether their activities act directly on the *FLC* gene.

*NUC2* expression is restricted to some plant tissues and organs and is developmentally controlled during early seedling establishment. *NUC2* expression is also significantly lower than *NUC1* expression. Interestingly, *NUC2* promoter activity is antagonistic to *NUC1* promoter activity (Figure 2; Supplemental Figures 5 to 7). The higher expression of *NUC2* could be a consequence of the absence or modification of *NUC1* protein. Increased expression seems to be at the transcriptional, and possibly also the posttranscriptional, level (Figure 3; Supplemental Figure 8). *NUC1* may play a direct role in regulating *NUC2* gene expression or, indirectly, by controlling the expression of an unknown repressor. In agreement with this, *NUC1* has also been implicated in the expression of *RIBOSOMAL PROTEIN* genes transcribed by RNA pol II (Kojima et al., 2007). Moreover, transcriptional and post-transcriptional regulation of pol II-transcribed genes by nucleolin proteins has been widely reported in animal cells (Mongelard and Bouvet, 2007; Tajrishi et al., 2011).

### Disruption of *NUC2* Affects rDNA Genomic Organization and Gene Silencing

The expression of 45S rDNA VAR1 in *nuc2-2* mutants is a surprising observation, considering the hypermethylated state of 5'

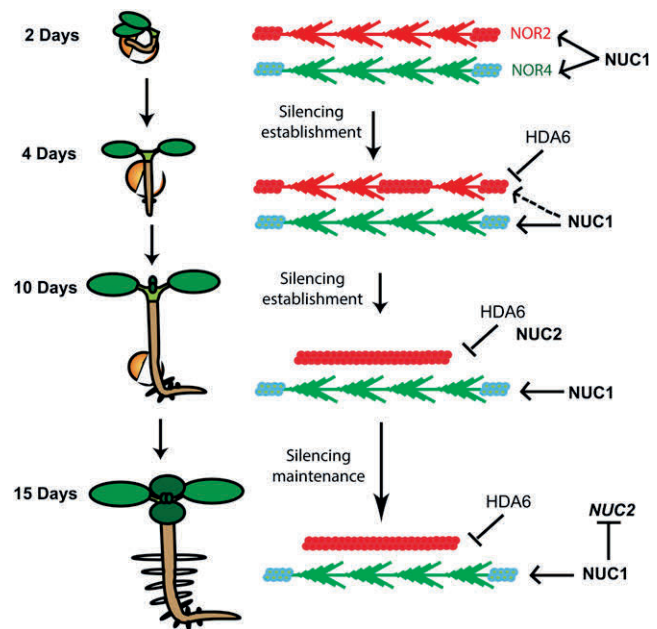
ETS rDNA in *nuc2-2* plants (Figure 6), which contrasts with the hypomethylation and chromatin decondensation of rDNA previously observed in *nuc1* plants (Pontvianne et al., 2007, 2010). Nevertheless, how nucleolin affects DNA methylation remains unclear. Moreover, in contrast with *nuc1* plants, in which transcription from the TIS is not greatly affected, we observed that most of the detected transcripts initiate from a single nucleotide position in *nuc2-2* plants (Figure 4). In wild-type and *nuc1* mutant plants, one signal might correspond to the transcription of rDNA VAR2 and another to VAR3. The unique TIS in *nuc2-2* could result from decreased levels of VAR3 pre-rRNA, assuming that the TIS of VAR1 pre-rRNA is similar to that of VAR2.

Quantitative analysis of 45S rDNA variants reveals no major changes in the amount of total rDNA in *nuc2-2* compared with wild-type plants. However, we observed a significant increase of VAR1 and decrease of VAR2 rDNA copy numbers in these plants (Figure 5). Similarly, plants expressing a low level of *NUC2* transcripts (*nuc2-1* mutant plants) display changes in the abundance of variants, but in these plants the amount of rRNA genes is increased (Supplemental Figure 2). This is in contrast with *fas* mutants, which display a reduction of rDNA copies and activation of VAR1, or *nuc1* mutants, where the number and abundance of rDNA variants are not affected (Figure 5) (Mozgová et al., 2010; Pontvianne et al., 2013). Disruption of the histone methyltransferases *ATXR5/6* also induces the expression of normally silent rDNA VAR1 and an increased or reduced number of silent and active rDNA copies, respectively (Pontvianne et al., 2012). However, in contrast with *atxr5/6*, we do not detect significant changes in the endoreplication of the rDNA variant copies in the *nuc2-2* mutants (data not shown). Remarkably, the relative abundance of rDNA variants is restored to the wild-type level in F1 siblings upon backcrossing the *nuc2-2* plants with wild-type plants, with repression of VAR1 and transcription of VAR2 and VAR3 (Figure 7). This shows that reintroduction of rDNA from wild-type plants, rather than the *NUC2* gene, is able to reestablish the wild-type functional organization of rDNA in *nuc2-2* plants.

In agreement with the observation that NOR2 is transcriptionally silent (Fransz et al., 2002), we have observed that inactive rRNA VAR1 genes localize mainly in NOR2, while the active VAR2 and VAR3 rRNA genes are in NOR4 (J. Sáez-Vásquez, F. Barneche, and C. Pikaard, unpublished data). Although we do not exclude alternative mechanisms, gene conversion (Schuermann et al., 2005) of rRNA could explain the variation in the abundance of rDNA variants in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants. Gene conversion might provoke the translocation of VAR1 copies between different NORs, thereby relocating rDNA VAR1 copies in largely hypomethylated regions. VAR1 copies are highly methylated in a wild-type context, and their increased abundance might explain the increased global DNA methylation levels of 5' ETS rDNA in *nuc2-2* plants. However, some rDNA VAR1 copies became hypomethylated, as detected by McrBC analysis (Figure 6; Supplemental Figure 13). In the wild type, VAR1 represents 50% of all rDNA; consequently, the increased number in *nuc2-2* plants makes it difficult to determine the contribution of each rDNA variant to global rRNA gene methylation levels (Supplemental Figure 12). It is also possible that NOR2 is

not completely silenced during seedling establishment (Figure 9); consequently, some VAR1 units might be transcribed and associated with a single nucleolus in *nuc2-2* (Figure 4D). Interestingly, VAR1 rDNA copies (located either in NOR2 or NOR4) associate with the nucleolus in *nuc2-2* plants, a relocation that probably correlates with their switch to a transcriptionally active state (Figure 4E).

So far, we cannot disentangle the respective effects of rDNA variant dosage, delocalization, and activation on the derepression of VAR1 in *nuc2* mutant plants. However, it is tempting to speculate that it is due to VAR1 relocation from NOR2 to NOR4. Indeed, it has been demonstrated that rDNA can be integrated and expressed at ectopic locations and form nucleolar structures (Karpen et al., 1988; Oakes et al., 1993; Floutsakou et al., 2013). Therefore, our results fit with a model in which the switch between active and/or repressed rDNA depends on the genomic and chromatin organization of the NOR (Preuss et al., 2008).



**Figure 9.** *NUC2* Is Required for Chromatin Dynamics during Developmental Transitions.

In this model, 45S rDNA VAR1 localizes in NOR2 (red) and VAR2 and VAR3 localize in NOR4 (green). Early in seed germination (2 d), both NOR2 and NOR4 are decondensed and transcriptionally active. NUC1 protein is associated with each NOR, as NUC1 binds to active genes (Pontvianne et al., 2010). Then, throughout germination, HDA6 participates in the chromatin silencing of rDNA VAR1 (Earley et al., 2010; Benoit et al., 2013). NOR2 becomes progressively silenced/condensed, and NUC1 dissociates. At 8 to 10 d, *NUC2* transcripts and protein accumulate and bind “silenced” chromatin to participate in the heterochromatin establishment of NOR2. At the end of seed germination transition, NUC1 might play a role in repressing *NUC2* gene expression at the transcriptional and/or posttranscriptional levels.

## A Role of Nucleolin Proteins during Developmental Transition

So far, duplicated genes have been associated with gene dosage and neofunctionalization (Magadum et al., 2013). The results presented in this work, associated with previous studies, indicate that conserved and duplicated nucleolin genes have antagonistic activities in controlling rDNA organization and expression. To our knowledge, only a few duplicated genes with antagonistic roles have been described in *Arabidopsis*, including the duplicated RecQ helicases involved in homologous recombination and DNA repair (Hartung et al., 2007). How do NUC1 and NUC2 functionally interact in *Arabidopsis*? NUC2 protein accumulation during seedling development (Figure 2) temporally correlates with NOR condensation and rDNA VAR1 repression (Earley et al., 2010; van Zanten et al., 2011; Benoit et al., 2013). Accordingly, upon heterochromatin establishment of NOR2, the expression of *NUC2* could be repressed by *NUC1* (Figure 3). Remarkably, both *NUC1* and *NUC2* proteins associate with chromatin and can bind nucleosomes, although only *NUC1* is able to assist remodeling (Figure 8; Supplemental Figure 9). As reported previously, *NUC1*, as well as human nucleolin, can bind transcriptionally competent rDNA chromatin and might facilitate rDNA transcription (Pontvianne et al., 2010; Cong et al., 2012). Meanwhile, *NUC2* might bind nucleosomes to induce and/or maintain a repressive rDNA chromatin state during seedling growth (Figure 9).

In animal and yeast cells, the maintenance of rDNA methylation and gene copy number plays an important role in genome integrity and regulation (Paredes and Maggert, 2009; Ide et al., 2010). In *Arabidopsis*, it has been demonstrated that rDNA sequences might enhance homologous recombination (Urawa et al., 2001). We also reported high variability of 45S rDNA variants in the genome of *Arabidopsis* ecotypes (Abou-Elail et al., 2011). Such a mechanism is subject to evolutionary constraints, as demonstrated by the observation that variations in genome size of *Arabidopsis* ecotypes are largely due to 45S rDNA copy number (Long et al., 2013). It would be interesting to determine how the variability of rDNA and nucleolin protein sequences, as well as other proteins involved in chromatin-based processes, can influence chromatin organization and the controlled expression of highly repeated sequences such as ribosomal genes.

## METHODS

### Plant Growth Conditions and Isolation of Mutants

All lines were derived from *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 ecotype. Seeds were first sown on Murashige and Skoog (MS) medium (4.7 g/L MS medium, 0.5 g/L MES, 10 g/L Suc, and 10 g/L plant agar) 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-h/8-h (light/dark) cycle (soil plants). Seeds corresponding to *nuc2-1* (SALK\_542511) and *nuc2-2* (GABI\_178D01) mutant plants were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.life.nott.ac.uk>). The *nuc1* and *fas2.4* (third generation) mutant lines used in this work have been described (*nuc1*: Kojima et al., 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010; *fas2.4*: Mozgová et al., 2010; Pontvianne et al., 2013).

### Immunoblotting on Total and Chromatin Protein Fractions

Plant material (0.1 g) was homogenized and extracted in 500  $\mu$ L of 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and a 1:100 dilution (v/v) of anti-protease cocktail inhibitor (Sigma). The extracts were cleared by centrifugation at 13,000g for 15 min and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

To obtain protein chromatin fractions from wild-type, *nuc1-1*, and *nuc1-2* plants, chromatin samples were prepared as described previously (Pontvianne et al., 2010) and proteins were extracted in 1 $\times$  SDS-Laemmli buffer.

Then, SDS-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (Sáez-Vasquez et al., 2004). The membranes were hybridized with a 1:10,000 dilution of  $\alpha$ -At-NUC1 or a 1:7,000 dilution of  $\alpha$ -At-NUC2 as described previously (Pontvianne et al., 2007, 2010).

### Methods Related to Nucleic Acid

Total RNA was extracted from 15-d-old *Arabidopsis* plants using Trizol reagent (Amersham Biosciences) and treated with Turbo DNase (Ambion) for 60 min to eliminate contaminant DNA. First-strand cDNA synthesis was performed on 1.5  $\mu$ g of treated RNA with the oligo(dT) and/or 3'ETS primer (for 3' ETS rDNA sequences) using the GoScript Reverse Transcription System kit following the manufacturer's instructions (Promega).

RT-PCR of 24 to 35 cycles was performed using a PTC-200 device (MJ Research). Primer pairs 5'*nuc1/3'nuc1*, 5'*nuc2/3'nuc2*, and 5'*3ets/3'3ets* were used to amplify *NUC1*, *NUC2*, and 3' ETS pre-rRNA transcripts, respectively.

Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 and MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR assay (Eurogentec). Primers 5'*nuc2q/3'nuc2q* and *q5'flc/q3'flc* were used to detect *NUC2* and *FLC* transcripts, respectively, and primers 5'*18S/3'18S*, 5'*25S/3'25S*, and 5'*ITS1/3'ITS1* were used to amplify 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences, respectively. The *Actin* gene was used as an internal standard, and results were analyzed using the comparative cycle threshold method relative to input.

For the relative abundance of each class of rDNA (variant), PCR was performed with primers 5'*3ets/3'3ets*. PCR products were run on the LabChip GX/GX II (Caliper; Life Sciences) and analyzed with the LabChip GX DNA Assay Analysis software (which calculates the size and concentration of each nucleic acid fragment) according to the manufacturer's instructions.

Primer extension analysis was performed using 15  $\mu$ g of total RNA and specific 5' end-labeled primers as described previously (Sáez-Vasquez et al., 2004). Primers used were *tis* for the detection of primary pre-rRNA precursors (+104 nucleotides from TIS) and *p* for the detection of primary pre-rRNA precursors cleaved at the P site (+1274 nucleotides from TIS). Primer 3'*U3* was used for the detection of U3snoRNA as a loading control.

### Cloning of *Arabidopsis NUC2* Promoter Sequences and Detection of GUS Activity

Approximately 1.5 kb of the *NUC2* promoter sequence was amplified from genomic DNA and fused to a GUS reporter gene in the vector pGWB433 (Nakagawa et al., 2007). The *pAtNUC1:GUS* construct in pCAMBIA 1381xa was described previously (Pontvianne et al., 2007).

Histochemical detection of GUS activity was performed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc) as a substrate. Seedlings were placed in X-Gluc buffer solution (1 mM X-Gluc, 100 mM Tris-HCl, pH 7, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM potassium ferrocyanide, and 0.5 mM potassium ferricyanide) and incubated at 37°C for 12 h. Samples were then incubated in 70% ethanol for 2 h and cleared in Hoyer's medium. For analysis of siliques, samples were placed in 90% acetone on ice



for 1 h, followed by X-Gluc buffer as described above. All microscopic GUS images were observed using a Zeiss Axioskop 2 microscope and recorded using a Leica DC 300 FX digital camera.

### ChIP and FISH

Antibodies against At-NUC1 and ChIP reactions were described previously (Pontvianne et al., 2007, 2010). PCR was performed using primers 5'*nuc2a/3'nuc2a*, 5'*nuc2b/3'nuc2b*, and 5'*nuc2c/3'nuc2c* to amplify *NUC2* sequences –466/–210, –307/–38, and –137/+141, respectively.

DNA FISH analysis was performed using nuclei from leaves of 4-week-old plants as described previously (Pontvianne et al., 2007). The biotin-labeled probe was detected using digoxigenin (1:200; Roche) followed by sheep anti-digoxigenin antibody conjugated with the fluorochrome Alexa 480 (1:200; Invitrogen). Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium with 1 µg/mL DAPI and then observed by confocal microscopy (Axio observer.Z1 microscope with the LSM700 scanning module; Zeiss). (A more detailed description of the immunofluorescence experiment is available in Pontvianne et al., 2012).

### Immunostaining

Immunofluorescence was performed using 4-week-old leaves (the wild type, *nuc1*, and *nuc2*). Treated leaves (Supplemental Methods) were incubated at 4°C overnight with α-At-NUC2 (1:500) and then with anti-rabbit antibody coupled with Alexa 488 (1:1000; Invitrogen) for 3 h at room temperature. Slides were then mounted in Vectashield containing DAPI solution. Observation and imaging were performed using a confocal microscope (LSM 700 from Zeiss).

### FANoS

The *nuc2-2* plants were crossed with wild-type Columbia-0 plants expressing FIBRILLARIN2 (FIB2) protein fused to yellow fluorescent protein (YFP) and under the control of the 35S cauliflower mosaic virus promoter. Then, F1 and F2 plants were selected to isolate homozygous *nuc2-2* plants containing 35S:FIB2:YFP transgene. Three-week-old leaves from the F3 generation were then used to isolate nuclei and nucleoli by FANoS as described previously (Pontvianne et al., 2013). The cell sorter used was an ARIA II special order (BD Biosciences). Total genomic DNA was extracted from nucleoli purified from wild-type and *nuc2-2* plants expressing the FIB:YFP construct and amplified by PCR to identify the rDNA associated with the nucleolus (i.e., those that are transcriptionally active).

### Bisulfite and McrBC Analyses

Genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* mutant plants was extracted using the DNA Easy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

For bisulfite analysis, 500 ng of DNA was digested overnight using 20 units of *Bam*HI restriction enzyme prior to bisulfite conversion. Bisulfite treatment was performed using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen). The primers –315 and +243 were used to amplify rRNA gene sequences (from –315 to +243); the resulting PCR products were cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced. Approximately 25 clones per sample were analyzed using the CyMATE method (Hetzl et al., 2007).

For McrBC analysis, 500 ng of DNA was digested using McrBC enzyme (Qiagen), which cuts methylated DNA. Then, PCR was performed on equal amounts of digested and undigested DNA using the HotStart goTag polymerase (Promega). PCR (35 cycles) was performed with primers 5'*3ets/3'3ets*, 5'*5s/3'5s*, 5'*AtLINE/3'AtLINE*, and 5'*AtSN1/3'AtSN1* to amplify rDNA sequences (45S and 5S) and transposable elements (At *LINE* and At *SN1*). As a control, we used the demethylated *nripe1* mutant.

### Nucleosome Reconstitution and Remodeling

Recombinant *Xenopus laevis* full-length histone proteins were purified from *Escherichia coli* cells as described earlier (Luger et al., 1999). The 255-bp DNA fragment containing the centrally positioned nucleosome sequence 601 at the middle or at the end of the sequence was amplified by PCR from pGEM3Z-601 (kindly provided by B. Bartholomew and J. Widom) and end labeled using T4-polymerase kinase in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Nucleosome reconstitution was performed by the salt dialysis method (Angelov et al., 2006). Carrier DNA (150 to 200 bp, 2 mg) and 50 ng of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled 601 DNA was mixed with equimolar amounts of histone octamer in nucleosome reconstitution buffer containing 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, and 5 mM β-mercaptoethanol. Nucleosomes (50 ng, 0.2 pmol) were incubated with RSC in remodeling buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% glycerol, 100 mg/mL BSA, 1 mM DTT, 0.02% Nonidet P-40, 40 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM ATP for 45 min. The reaction was stopped by adding 1 µg of plasmid DNA. Nucleosome position was then analyzed by native PAGE.

### Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: At1g48920 (*NUC1*) and At3g18610 (*NUC2*).

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure 1.** Phylogenetic Tree of Nucleolin Proteins from Plants.

**Supplemental Figure 2.** Characterization of *nuc2-1* Mutant Plants.

**Supplemental Figure 3.** Characterization of Nucleolin Double Mutants.

**Supplemental Figure 4.** List of Genes Upregulated or Downregulated in *nuc2-2* Plants Identified by RNA-seq.

**Supplemental Figure 5.** Analysis in Silico to Compare Relative Expression Levels of *NUC1* and *NUC2*.

**Supplemental Figure 6.** *NUC1* and *NUC2* Expression in Response to Auxin.

**Supplemental Figure 7.** *NUC2* and *NUC1* Promoter Activities during Silique Development.

**Supplemental Figure 8.** Mechanisms Controlling *NUC2* Gene Expression.

**Supplemental Figure 9.** Titration of RSC, EMSA with *NUC1* and *NUC2*, and Immunolocalization of *NUC2*.

**Supplemental Figure 10.** Immunolocalization of *NUC1* in Wild-Type and *nuc2* Mutant Plants.

**Supplemental Figure 11.** LabChip Data of the Abundance of rDNA Variants in Wild-Type, *nuc2*, *nuc2 gNUC2*, *nuc1*, and *fas2* Plants.

**Supplemental Figure 12.** Bisulfite Analysis of 3' ETS rDNA Sequences.

**Supplemental Figure 13.** PCR and LabChip Data with Different PCR Cycles for McrBC Experiments.

**Supplemental Figure 14.** PCR and LabChip Data with Different PCR Cycles for the Abundance of rDNA Variants in Wild-Type, *nuc2*, and Wild-Type × *nuc2* Backcrossed Plants.

**Supplemental Table 1.** FISH Data in Wild-Type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* Plants.

**Supplemental Table 2.** Primer List.

**Supplemental Methods.** Immunostaining, RNA-seq, Bisulfite, EMSA, and Bioinformatics Analyses.

**Supplemental Data Set 1.** Alignment of Nucleolin Proteins.**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank F. Barneche for critical reading of the manuscript and R. Cooke for comments and correction of the English, M. Laudie for bisulfite sequencing, Marie-Christine Carpentier and Christelle Llauro for RNA-seq bioinformatics analysis, Z. Haftek-Terreau for the production of histone recombinant proteins, and B. Bartholomiew and J. Widom for providing pGEM3Z-601. We also thank the flow cytometry facility of Montpellier RIO Imaging. Mutant plants *met1-1*, *fas2-4*, and *nripe1* were provided by C. Pikaard, J. Fajkus, and T. Lagrange, respectively. This work was supported by the CNRS (Grants CNRS/JSPS 2008-2009 number PRC449 and ANR SVSE2\_SUBCELIF 087217). M.A.-E. was supported by a fellowship from the Egyptian government and N.D. by a fellowship from the Université de Perpignan Via Domitia.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

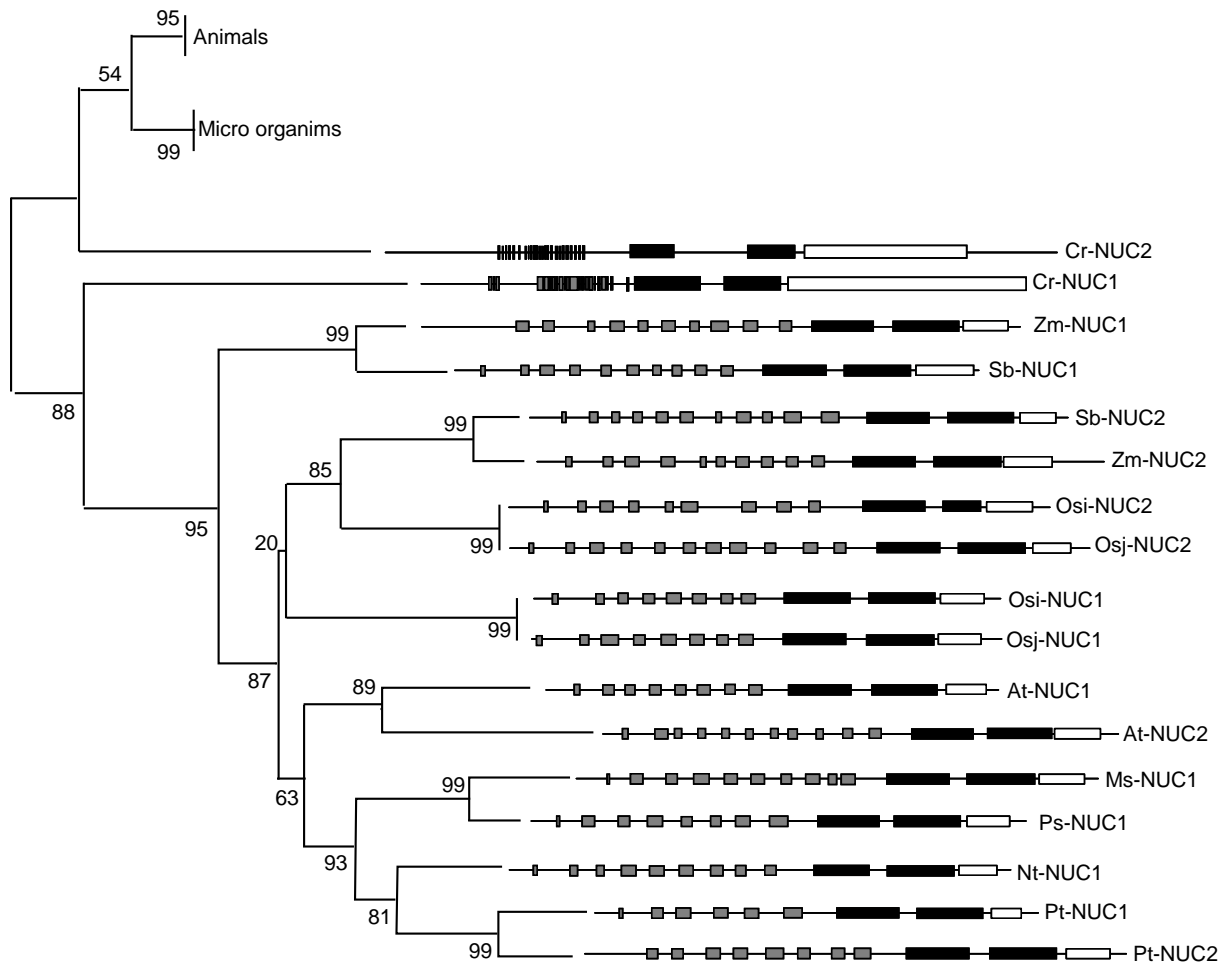
J.S.-V. conceived and directed the project and wrote the article. K.N., P.B., and M.E. designed research. N.D. and M.A.-E. conducted the majority of experiments. F.P. and S.D. performed FANoS and nucleosome assays. S.N. and S.R. performed RNA sequence analysis. H.K., S.U., A.d.B., P.C., and R.M. contributed to the research.

Received February 3, 2014; revised February 24, 2014; accepted March 10, 2014; published March 25, 2014.

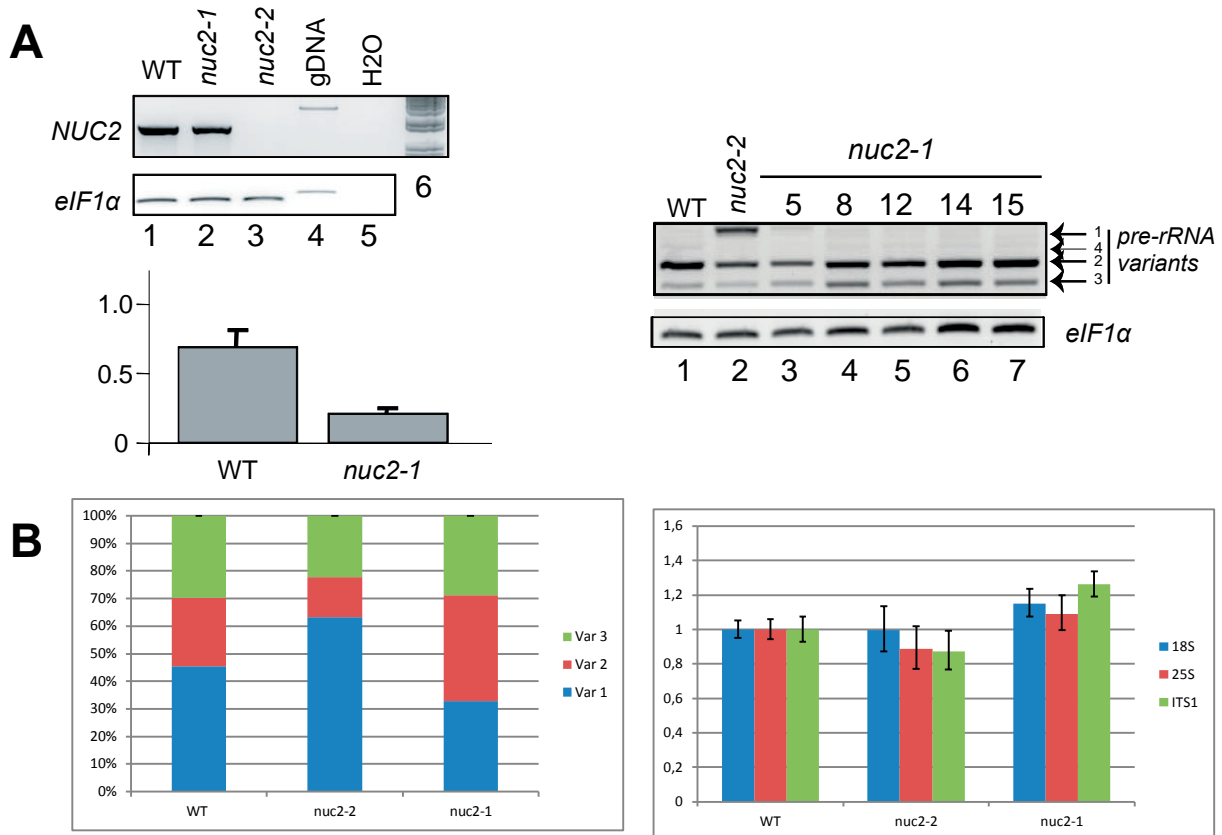
**REFERENCES**

- Abou-Ellail, M., Cooke, R., and Sáez-Vásquez, J.** (2011). Variations in a team: Major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**: 294–299.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongélard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., and Bouvet, P.** (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* **25**: 1669–1679.
- Benoit, M., Layat, E., Tourmente, S., and Probst, A.V.** (2013). Heterochromatin dynamics during developmental transitions in *Arabidopsis*—A focus on ribosomal DNA loci. *Gene* **526**: 39–45.
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., and Bouvet, P.** (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* **40**: 9441–9454.
- Crevillén, P., and Dean, C.** (2011). Regulation of the floral repressor gene FLC: The complexity of transcription in a chromatin context. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 38–44.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S.** (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: Suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* **24**: 1119–1132.
- Floutsakou, I., Agrawal, S., Nguyen, T.T., Seoighe, C., Ganley, A.R., and McStay, B.** (2013). The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Res.* **23**: 2003–2012.
- Franz, 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.
- Grummt, I., and Längst, G.** (2013). Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**: 393–404.
- Hartung, F., Suer, S., and Puchta, H.** (2007). Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 18836–18841.
- Hetzl, J., Foerster, A.M., Raidl, G., and Mittelsten Scheid, O.** (2007). CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J.* **51**: 526–536.
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T.** (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**: 693–696.
- Jakociunas, T., Domange Jordö, M., Ait Mebarek, M., Bünner, C.M., Verhein-Hansen, J., Oddershede, L.B., and Thon, G.** (2013). Subnuclear relocalization and silencing of a chromosomal region by an ectopic ribosomal DNA repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: E4465–E4473.
- Karpen, G.H., Schaefer, J.E., and Laird, C.D.** (1988). A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev.* **2**: 1745–1763.
- Khurts, S., Masutomi, K., Delgermaa, L., Arai, K., Oishi, N., Mizuno, H., Hayashi, N., Hahn, W.C., and Murakami, S.** (2004). Nucleolin interacts with telomerase. *J. Biol. Chem.* **279**: 51508–51515.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Sáez-Vásquez, J., Echeverría, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S., and Nakamura, K.** (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* **49**: 1053–1063.
- Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S.** (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* **13**: 599–609.
- Layat, E., Sáez-Vásquez, J., and Tourmente, S.** (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 267–276.
- Lolas, I.B., Himanen, K., Grönlund, J.T., Lynggaard, C., Houben, A., Melzer, M., Van Lijsebettens, M., and Grasser, K.D.** (2010). The transcript elongation factor FACT affects *Arabidopsis* vegetative and reproductive development and genetically interacts with HUB1/2. *Plant J.* **61**: 686–697.
- Long, Q., et al.** (2013). Massive genomic variation and strong selection in *Arabidopsis thaliana* lines from Sweden. *Nat. Genet.* **45**: 884–890.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J.** (1999). Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* **119**: 1–16.
- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., and Ravikesavan, R.** (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* **92**: 155–161.
- Mongelard, F., and Bouvet, P.** (2007). Nucleolin: A multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* **17**: 80–86.
- Mozgová, I., Mokros, P., and Fajkus, J.** (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 2768–2780.
- Nakagawa, T., et al.** (2007). Improved Gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2095–2100.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W., and Nomura, M.** (1993). Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2441–2455.
- Paredes, S., and Magerl, K.A.** (2009). Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 17829–17834.
- Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M.A., Fuchs, J., and Schubert, I.** (2004). Chromosome territory

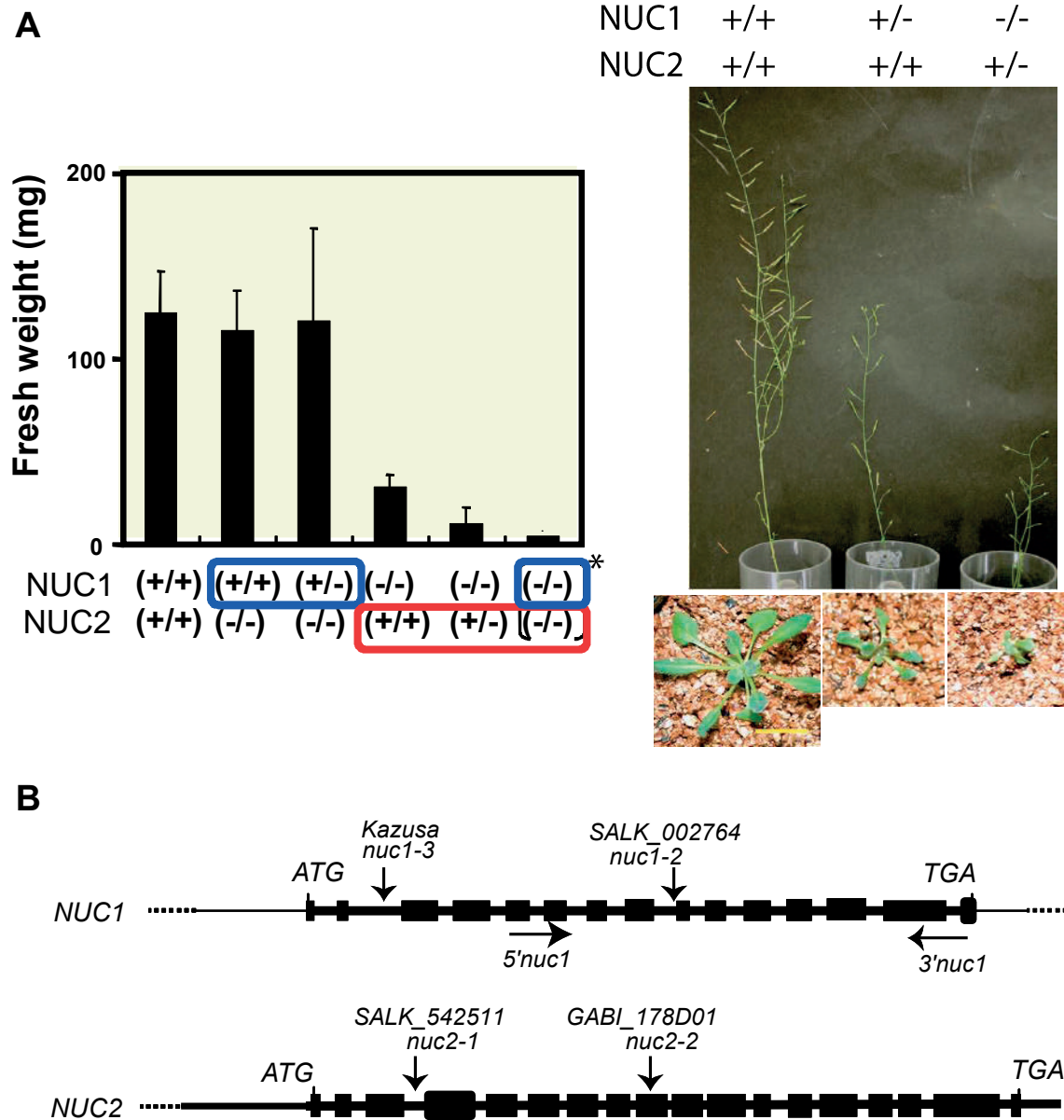
- arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
- Petricka, J.J., and Nelson, T.M.** (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* **144**: 173–186.
- Pontvianne, F., et al.** (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **6**: e1001225.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Feng, W., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., and Pikaard, C.S.** (2012). Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev.* **26**: 945–957.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Mozgová, I., Hassel, C., Pontes, O.M., Tucker, S., Mokros, P., Muchová, V., Fajkus, J., and Pikaard, C.S.** (2013). Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev.* **27**: 1545–1550.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., and Sáez-Vásquez, J.** (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* **18**: 369–379.
- Preuss, S.B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R.J., Mosher, R., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Baulcombe, D.C., Viegas, W., and Pikaard, C.S.** (2008). Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol. Cell* **32**: 673–684.
- Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., and LeRoy, G.** (2007). Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell Biol.* **27**: 937–948.
- Sáez-Vásquez, J., and Gadal, O.** (2010). Genome organization and function: A view from yeast and Arabidopsis. *Mol. Plant* **3**: 678–690.
- Sáez-Vásquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverría, 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.
- Schuermann, D., Molinier, J., Fritsch, O., and Hohn, B.** (2005). The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet.* **21**: 172–181.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., and Tuteja, N.** (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* **4**: 267–275.
- Tuteja, R., and Tuteja, N.** (1998). Nucleolin: A multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**: 407–436.
- Urawa, H., Hidaka, M., Ishiguro, S., Okada, K., and Horiuchi, T.** (2001). Enhanced homologous recombination caused by the non-transcribed spacer of the rDNA in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 546–555.
- Van Lijsebettens, M., and Grasser, K.D.** (2010). The role of the transcript elongation factors FACT and HUB1 in leaf growth and the induction of flowering. *Plant Signal. Behav.* **5**: 715–717.
- van Zanten, M., Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P., and Soppe, W.J.** (2011). Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 20219–20224.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**: 635–648.



**Supplemental Figure 1:** The phylogenetic tree was generated with MEGA4 software, using Neighbour Joining method coupled with 1000 bootstrap tests. The percentage value of Bootstrap is shown. Schematic of nucleolin and nucleolin-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, Q9FVQ1 (At-NUC1) and Q1PEP5 (At-NUC2), *Oryza sativa* ssp. *japonica*, Q6Z1C0 (Osj-NUC1) and Q7XTT4 (Osj-NUC2); *Oryza sativa* ssp. *indica*, BGIOSIBCE026772 (Osj-NUC1) and BGIOSIBCE016635 (Osj-NUC2), *Sorghum bicolor*, Sb07g005510 (Sb-NUC1), and Sb01g019710 (Sb-NUC2); *Zea mays* FGP025 (Zm-NUC1) and FGT019 (Zm-NUC2), *Populus trichocarpa*, 002310655 (Pt-NUC1) and 002307174 (Pt-NUC2), *Medicago sativa*, T09648 (Ms-NUC1), *Nicotiana tabacum* Q8LNZ4 (Nt-NUC1), *Pisum sativum* T06458 (Ps-NUC1), *Chlamydomonas reinhardtii* XP\_001689665.1 (CrNUC1) and GO:0003676 (CrNUC2).

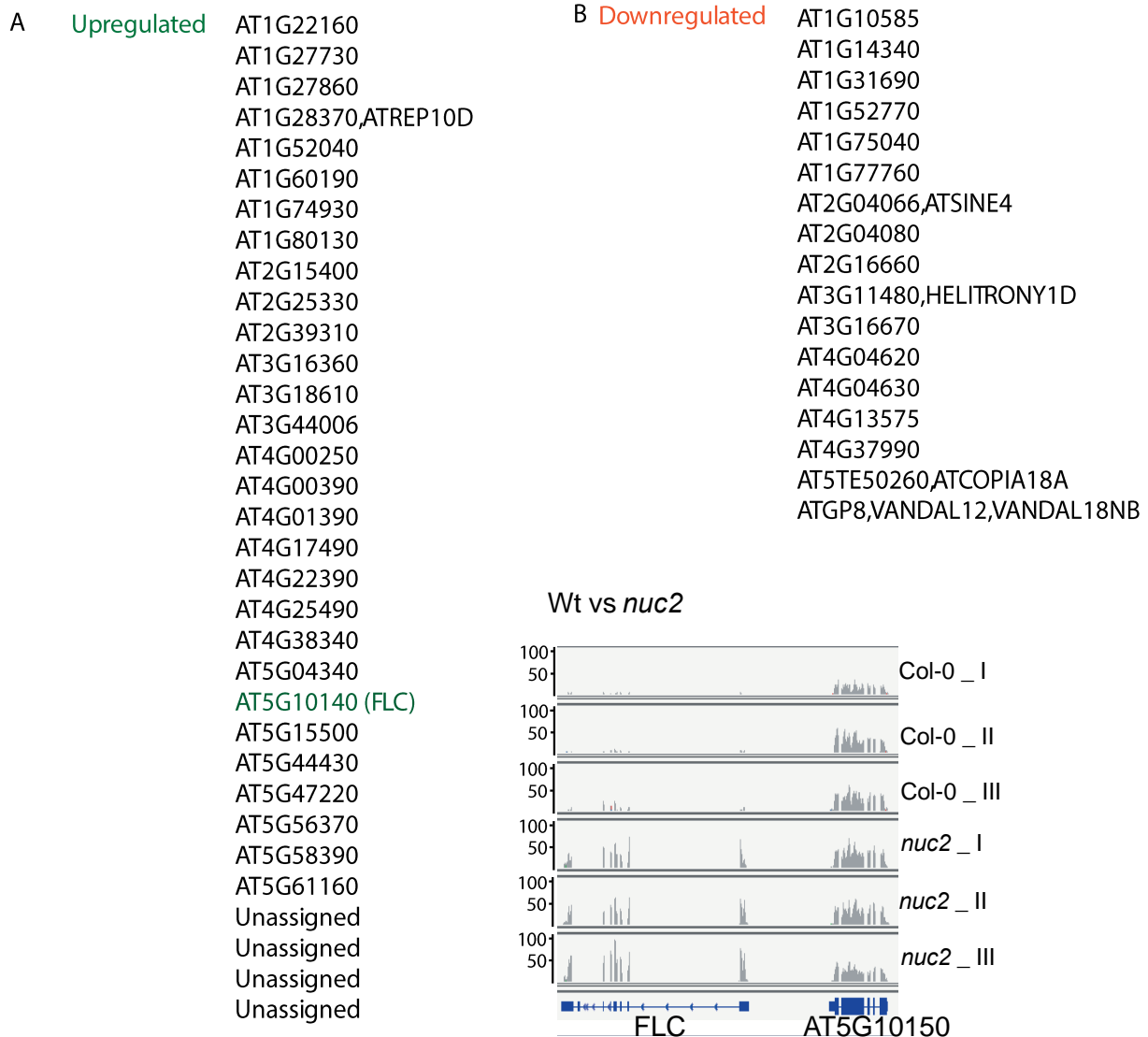


**Supplemental Figure 2: A) Left:** RT-PCR and RT-qPCR reactions using cDNA prepared from 15 day-old WT (lane 1), *nuc2-1* (lane 2) and *nuc2-2* (lane 3) seedlings and primers 5'*nuc2*/3'*nuc2* or 5'*nuc2q*/3'*nuc2q* to detect *NUC2* transcripts. Amplification of *eIF1α* transcripts was performed to verify similar amounts of cDNA in each sample. Absence of genomic contamination in the cDNA samples was verified by amplification of *eIF1α* genomic DNA that generates higher molecular size bands (lane 4). **Right:** RT-PCR reactions using cDNA prepared from 15 day-old WT (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), and *nuc2-1* (lanes 3-7) seedlings and primers 5'*3ets*/3'*3ets* to detect 3'ETS pre-rRNA respectively. Amplification of *eIF1α* transcripts was performed to verify similar amounts of cDNA in each sample. **B) Left:** PCR amplification of 3'ETS sequences using genomic DNA from WT, *nuc2-2*, *nuc2-1* mutant plants. Relative abundance of each rDNA variant was determined using a LabChip GX system. The bar graphs show the percentage of rDNA VAR1 (blue), VAR2 (red) and VAR3 (green). **Right:** qPCR analysis to amplify 18S, 25S and ITS1 rDNA sequences respectively from WT, *nuc2-2*, *nuc2-1* mutant plants. The bar graphs show relative amounts of rDNA 18S (blue), 25S (red) and ITS1 (green).



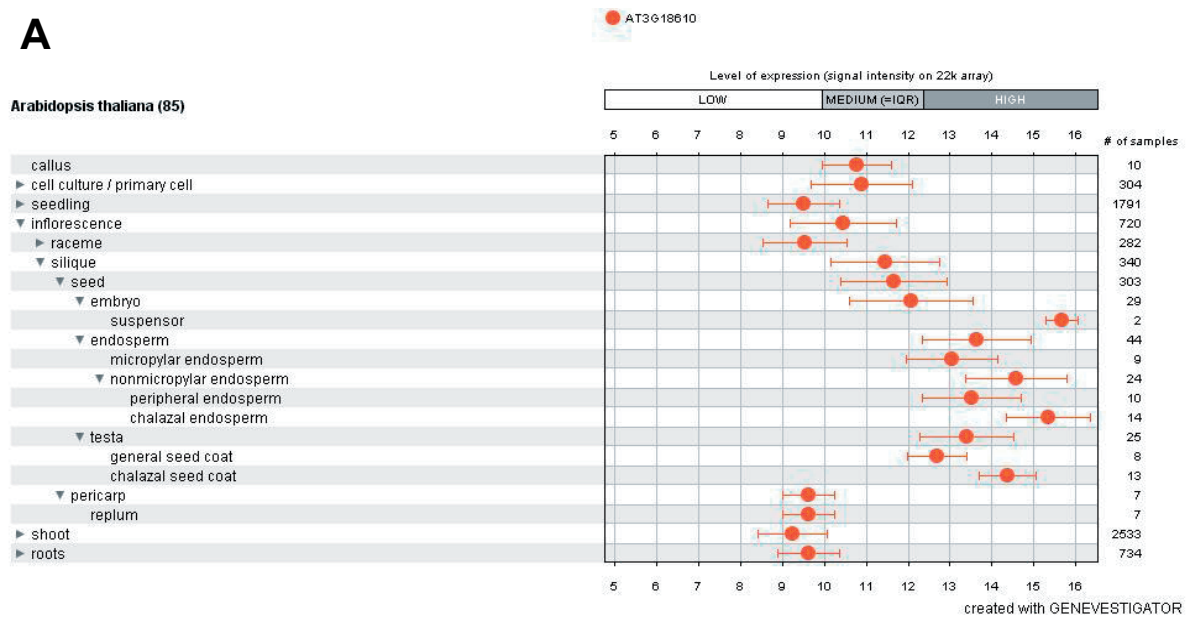
**Supplemental Figure 3: A)** Analysis of WT, *nuc1-3* (Kojima et al., 2007), *nuc2-1* (SALK\_542511) and *nuc1-3nuc2-1* double mutant plants. Left: Bar graph shows fresh weight of WT, *nuc2-1* (with two or one *NUC1* gene), *nuc1-3* (with two or one *NUC2* gene) and *nuc1-3nuc2-1* double mutant plants. Right: WT and *nuc1-3* containing one *NUC2* gene plants grown on soil. **B)** Diagram of *NUC1* and *NUC2* genes from the ATG start to the TGA stop codon is shown. The black boxes correspond to exons separated by introns. The T-DNA insertion in the *NUC1* and *NUC2* mutant plants is indicated.

Supplemental Data. Durut et al. (2014). Plant Cell 10.1105/tpc.114.123893

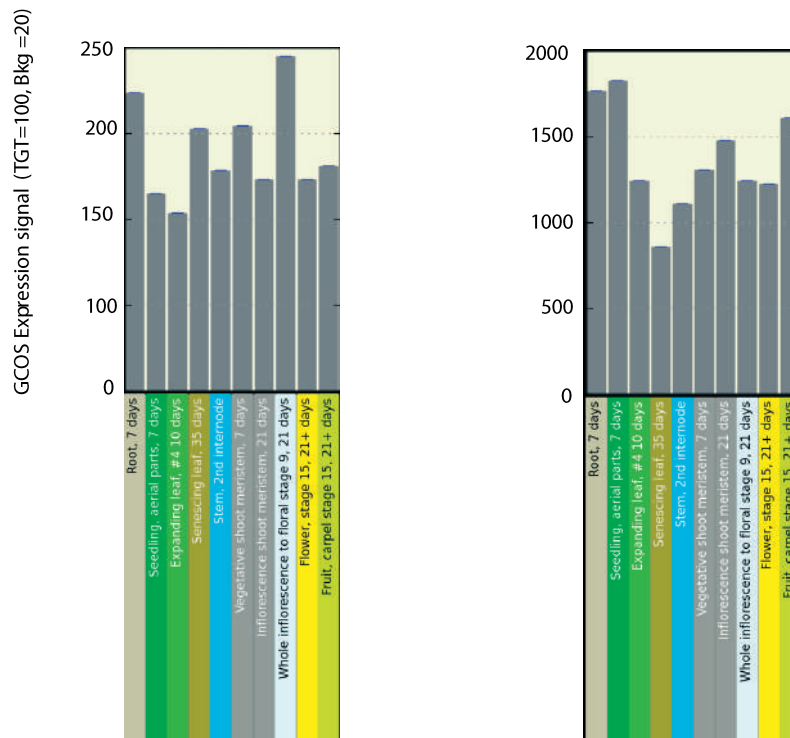


**Supplemental Figure 4:** RNAseq analysis of *nuc2-2* plants. List of up and down-regulated genes in *nuc2-2* mutant compared to WT plants. FLC (green) is highlighted. The graph shows expression of FLC in three WT and *nuc2-2* samples. The identification of At3g18610 (*NUC2*) among the up-regulated genes is due to the accumulation of truncated (upstream, but not downstream of the T-DNA insertion) and reversed transcripts originated from 35S promoter located in the LB border of the T-DNA insertion.

**A**

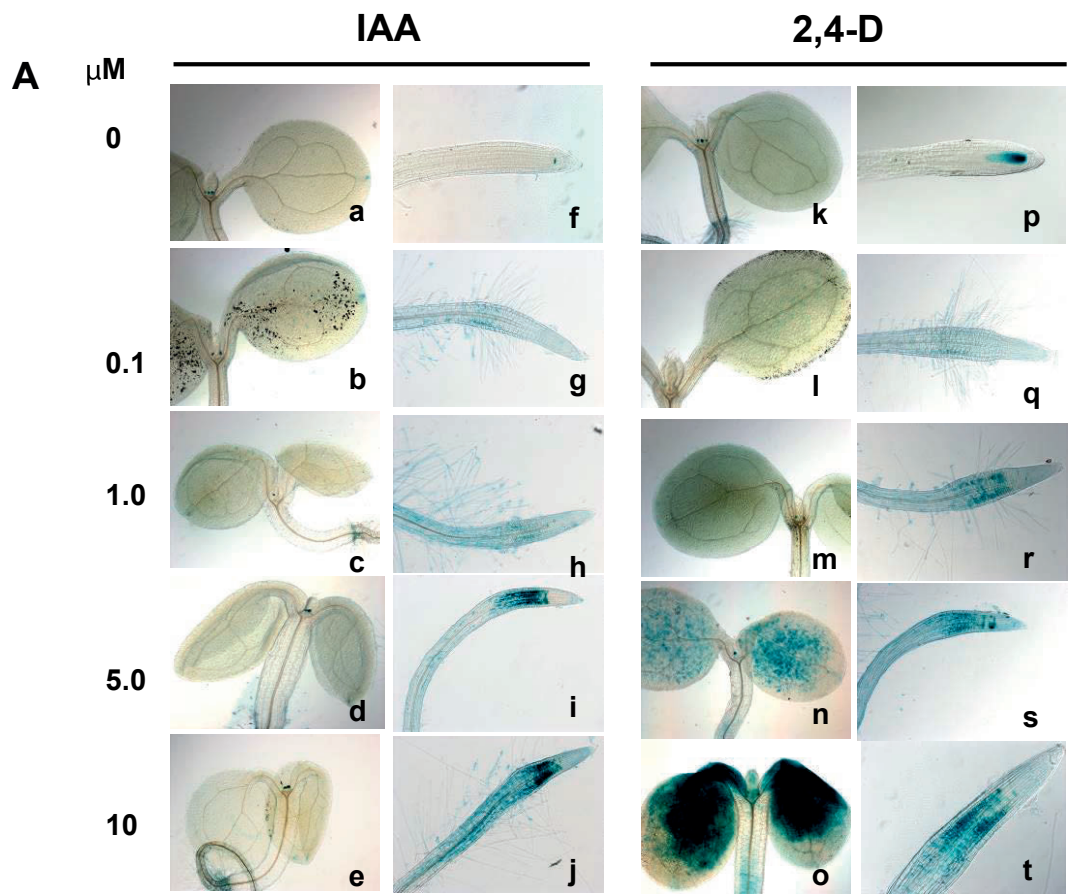


**B**

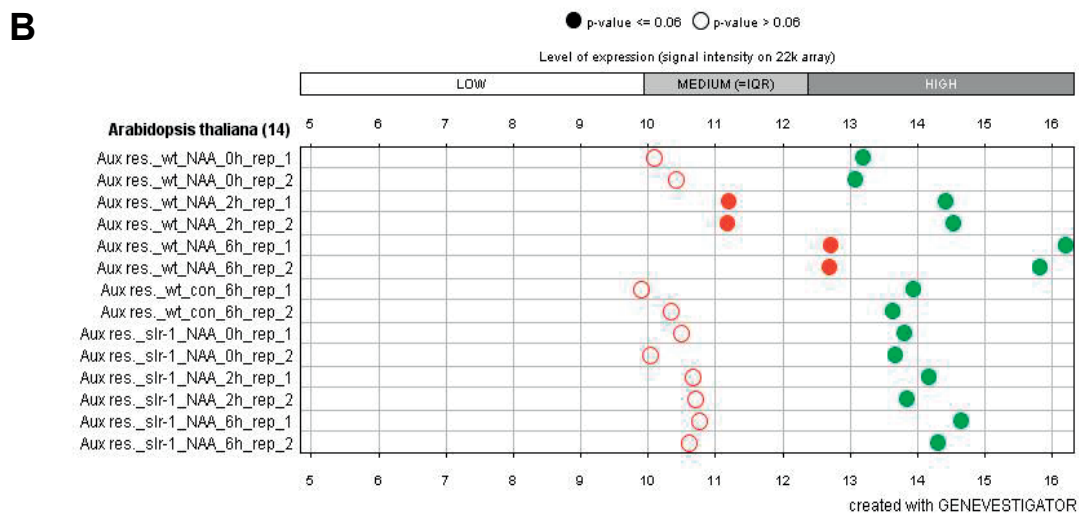


**Supplemental Figure 5:** Analysis *in silico* to compare relative expression level of *NUC1* and *NUC2* genes. Data were obtained from microarray available ([www.bar.utoronto.ca/welcome.htm](http://www.bar.utoronto.ca/welcome.htm) and [www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/)).

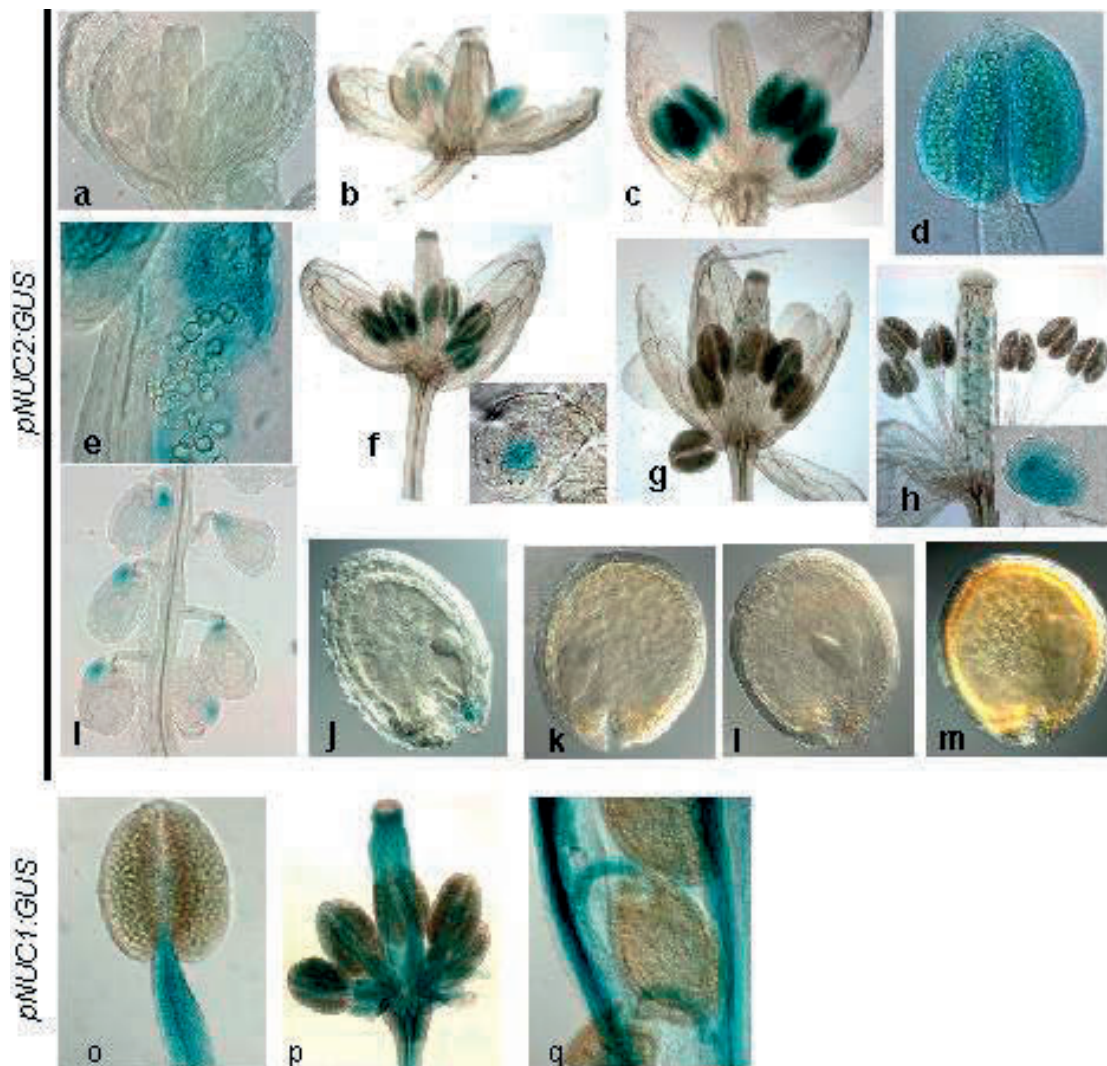




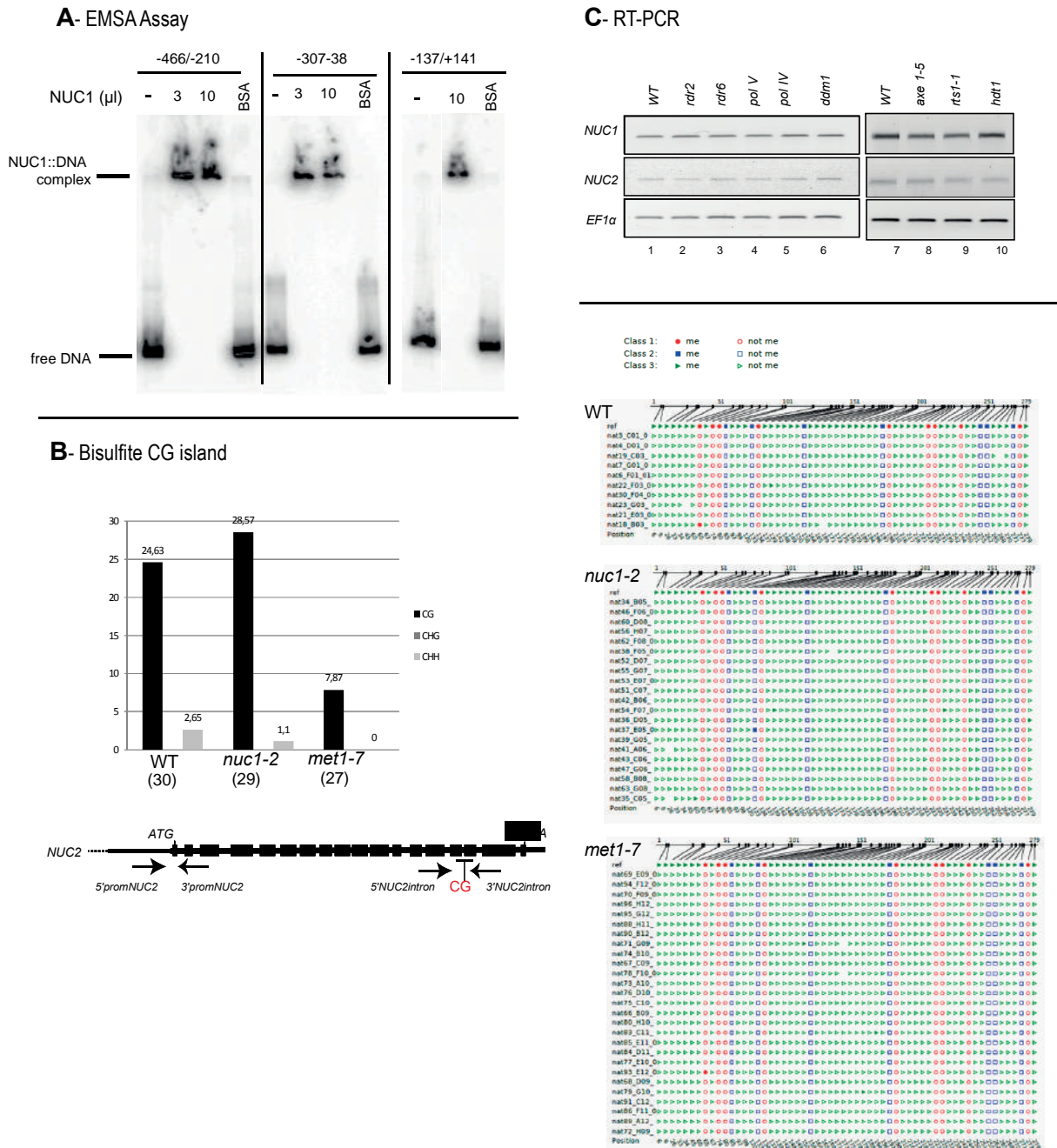
● AT3G18810 ● AT1G48920



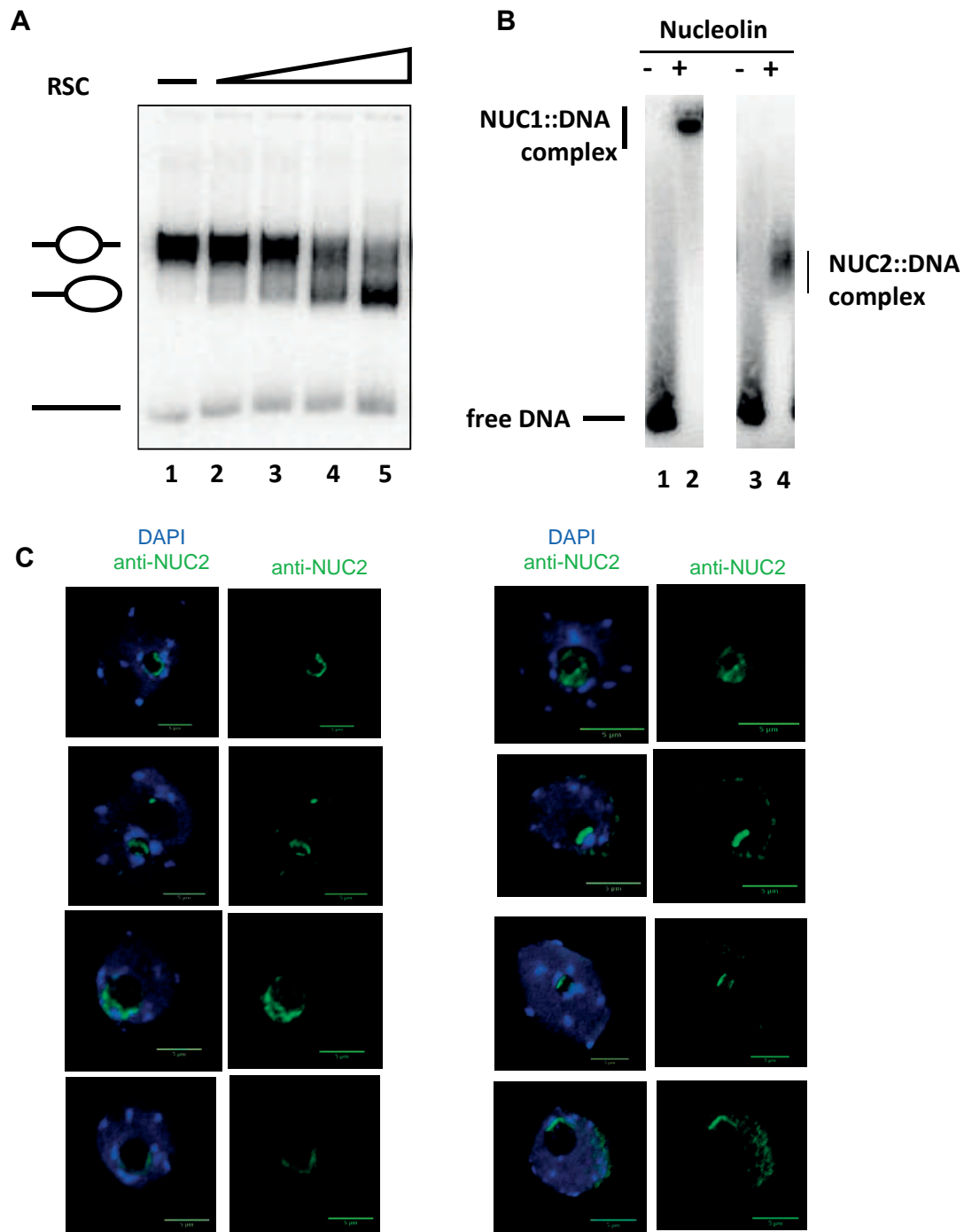
**Supplemental Figure 6: A)** Five day-old *A. thaliana* seedlings grown on Wattman/MS medium were transferred for 24h to MS liquid medium containing 0, 0.1, 1.0, 5.0 and 10  $\mu\text{M}$  of IAA (a-j) or 2,4 D (k-t). **B)** Analysis *in silico* to compare relative expression levels of *NUC1* (green dots) and *NUC2* (red dots) genes in response to auxin. Data were obtained from a microarray available on [www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/).



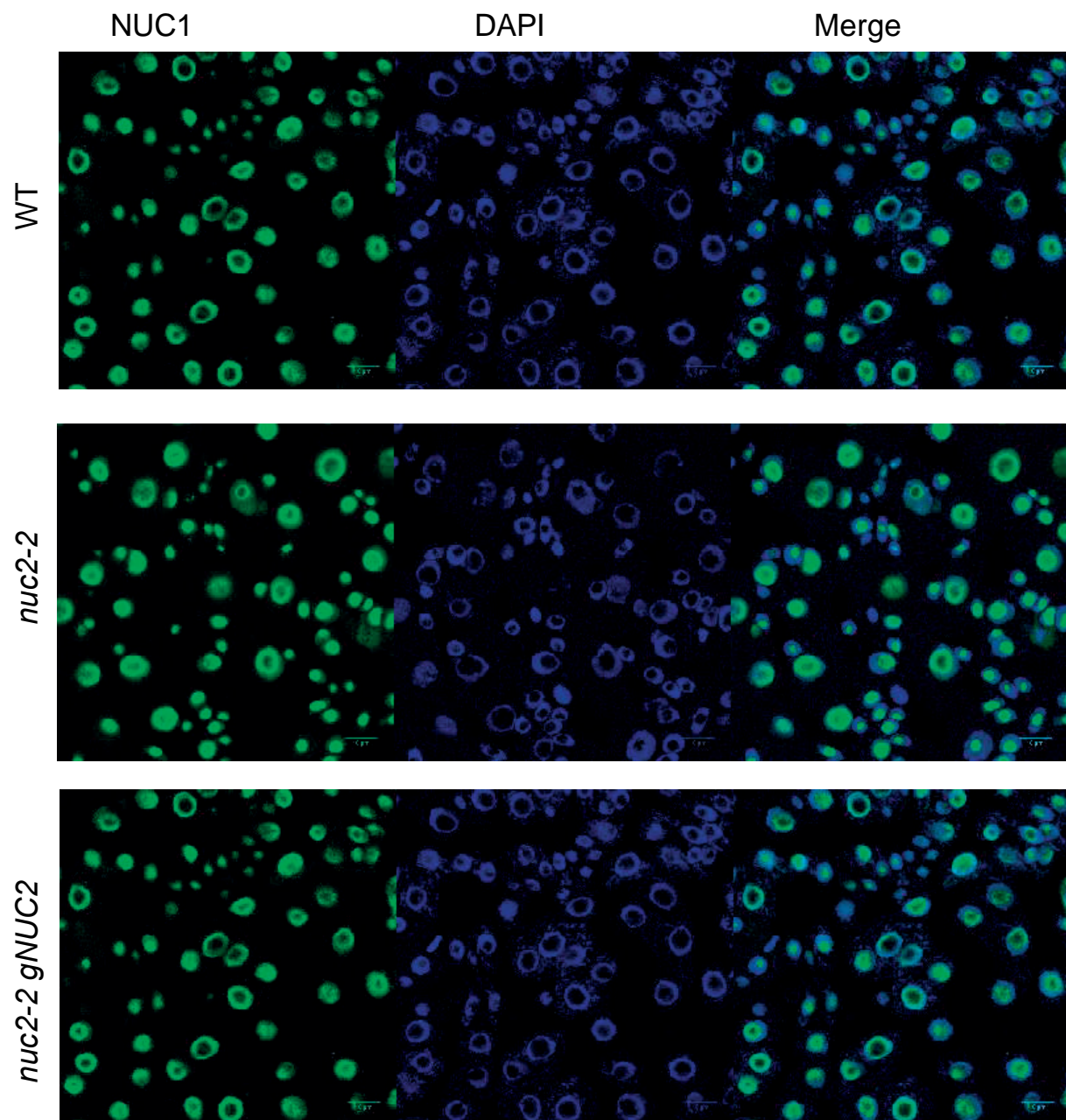
**Supplemental Figure 7:** GUS staining is not detected at stage 8 (a) or before (not shown), but it appears continually in anthers from stage 9 to stage 11 (b-c and f). GUS staining is detected in the pollen grain sacs, mainly in the tapetum cells and in the walls or parenchyma cells (d) but not in young pollen grains (e). At stage 11, GUS staining decreases in anthers but appears early in nucellus and/or embryo sac (f and insert). Then, at stage 12, the GUS staining increases in pistils (g) and it is clearly observed in embryo sacs at stage 15 (h and insert). Finally, GUS staining is detected at globular stage in the mycropilar (i-j) to disappear at heart (k), torpedo (l) and linear cotyledon (m). Interestingly, *NUC1* promoter activity, is detected in filament (o), pistil at stage 12 (p) and mycropilar at globular stage (q). In these tissues and organs we do not observe GUS staining activity when reporter gene is fused to *NUC2* promoter sequences (compare o, p, q with d, g and i).



**Supplemental Figure 8: A)** NUC1 binds *NUC2* sequences. Analysis of NUC1 binding activity on 4% polyacrylamide gel. EMSA was performed with 3 and 10  $\mu\text{L}$  of His-NUC1 recombinant protein (20 ng/ $\mu\text{L}$ ). BSA was used as control protein for binding activity. **B)** Bisulfite sequencing analysis of *NUC2* gene in WT, *nuc1-2* and *met1-7* plants. Left: The Bar graph shows the representation (%) of methylated sites in the intron sequence. Right: Graphical representation of bisulfite sequencing in the promoter. The images were generated by using CyMATE. **C)** RT-PCR reactions to detect *NUC1* and *NUC2* transcripts in *rdr2*, *rdr6*, *pol IV*, *pol V*, *ddm1*, *axe 1-5*, *rts1-1* and *hdt1* mutant plants.



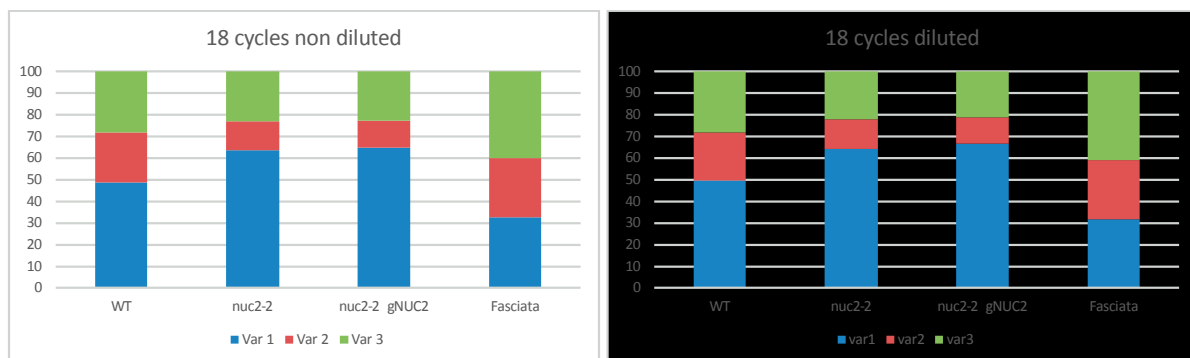
**Supplemental Figure 9: A)** Titration of RSC in nucleosome remodeling assay. Nucleosomes incubated with increasing amount of RSC (lanes 2-5) result in an efficient mobilization and formation of end-positioned nucleosomes **B)** Incubation of NUC1 (lane 2) or NUC2 (lane 4) with radiolabelled DNA. Lanes 1 and 3; *NUC2* sequence (-307/-38) alone. Protein::DNA complexes are resolved in a 1% agarose gel in 0.5X TBE buffer conditions. Note that NUC1 protein forms a protein-DNA complex that migrates more slowly compared with the protein-DNA complex formed by NUC2 protein. **C)** Immunolocalization of NUC2 in leaves from *nuc1* plants. The NUC2 signal (green) practically co-localizes with chromatin counterstained with DAPI (blue) situated in the periphery of the nucleolus. This is observed consistently in different *nuc1* nuclei.



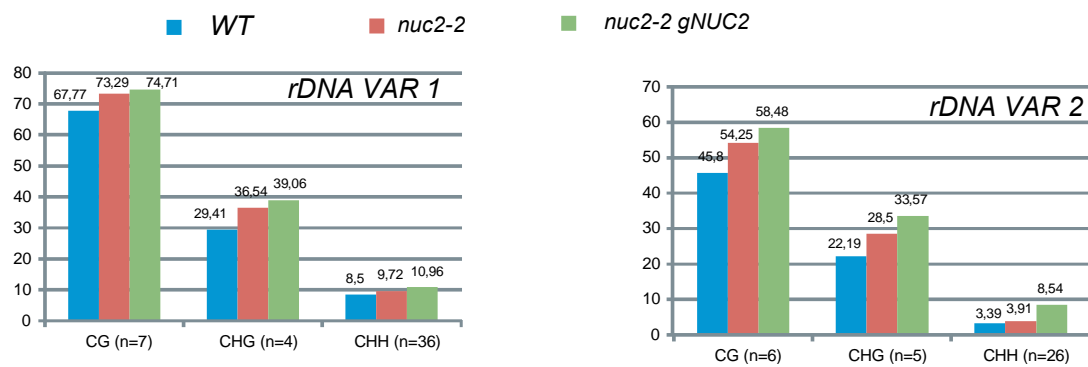
**Supplemental Figure 10:** Immunolocalization of NUC1 in WT, *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants. Nucleolin was detected in the nucleolus of WT and mutated plants. Immunostaining was performed using antibodies against NUC1 peptide described previously and Alexa 488 (Roche).

Supplemental Data. Durut et al. (2014). Plant Cell 10.1105/tpc.114.123893

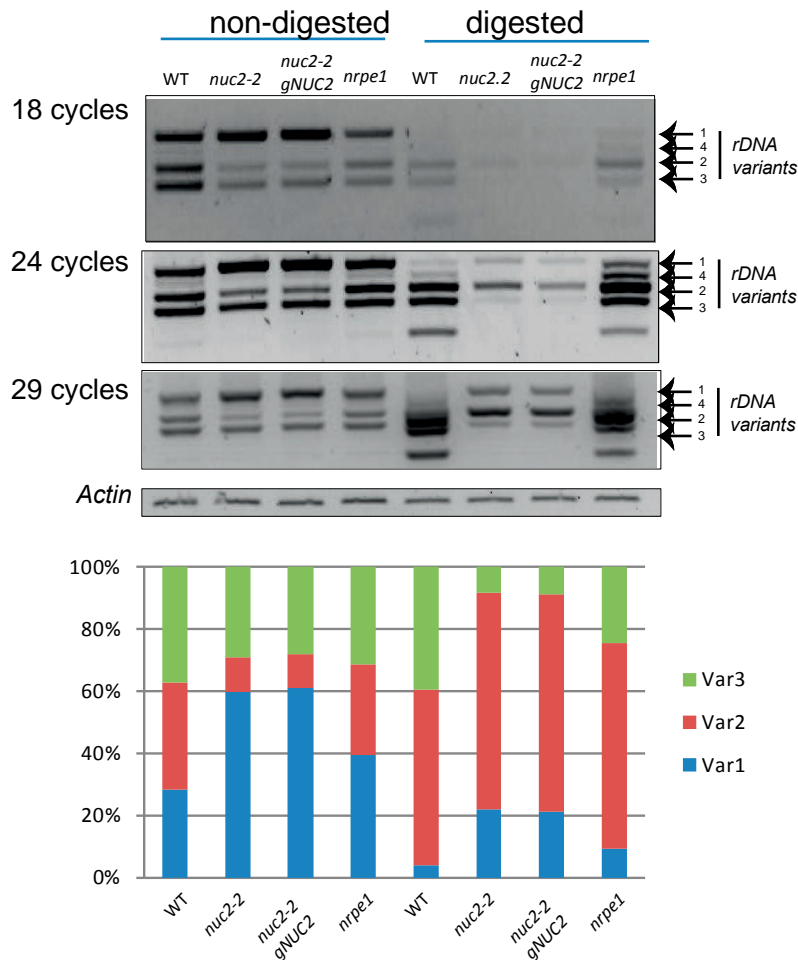
|                     | 24 Cycles |       |       | 24 Cycles (diluted samples) |       |       |
|---------------------|-----------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|
|                     | VAR1      | VAR2  | VAR3  | VAR1                        | VAR2  | VAR3  |
| WT                  | 45,43     | 24,8  | 29,77 | 45,85                       | 24,55 | 29,6  |
| <i>nuc2-2</i>       | 61,42     | 13,67 | 24,91 | 62,59                       | 12,31 | 25,1  |
| <i>nuc2-2 gNUC2</i> | 64,6      | 11,07 | 23,04 | 64,03                       | 11,84 | 24,13 |
| <i>nuc1-2</i>       | 44,64     | 29,51 | 25,85 | 44,54                       | 27,99 | 27,47 |
| <i>fas2-4</i>       | 27,28     | 31,47 | 41,25 | 26,46                       | 31,36 | 42,17 |
|                     | 18 cycles |       |       | 18 cycles (diluted samples) |       |       |
|                     | VAR1      | VAR2  | VAR3  | VAR1                        | VAR2  | VAR3  |
| WT                  | 48,66     | 23,15 | 28,19 | 49,69                       | 22,18 | 28,13 |
| <i>nuc2-2</i>       | 63,62     | 13,62 | 22,76 | 64,3                        | 13,33 | 22,37 |
| <i>nuc2-2 gNUC2</i> | 64,63     | 12,71 | 22,66 | 66,59                       | 12,07 | 21,34 |
| <i>fas2-4</i>       | 32,56     | 27,46 | 39,98 | 31,85                       | 27,4  | 40,75 |



**Supplemental Figure 11:** PCR and LabChip experiments to determine relative abundance of rDNA variants in WT, *nuc1*, *nuc2*, *nuc2-2 gNUC2* and *fas2* mutant plants. LabChip experiment was realized using 18 or 24 cycles and diluted (1:4) or undiluted samples.



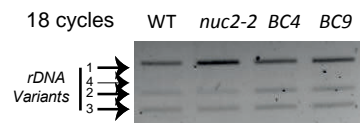
**Supplemental Figure 12:** Bisulfite sequencing analysis. The bar graphs show the percentage of methylated sites in the 3'ETS rRNA gene sequences (VAR1 and VAR2) from WT (79), *nuc2-2* (81) and *nuc2-2 gNUC2* (78) mutant plants in a CG, CHG and CHH context. *n*= number of potentially methylated sites.



**Supplemental Figure 13:** Top, Genomic DNA from WT, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2* and *nrpe1* plants digested or not with McrBC. Amplifications of 3'ETS were performed with 18, 24 and 29 cycles. Actin amplification was performed to verify similar amount of DNA. Bottom, Bar graph shows LabChip experiments (using PCR with 29 cycles) to determine relative abundance (%) of rDNA variants in MCrBC treated or untreated genomic DNA from WT, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2* and *nrpe1* plants.



Supplemental Data. Durut et al. (2014). Plant Cell 10.1105/tpc.114.123893



|               | 24 Cycles |       |       | 24 Cycles diluted |       |       |
|---------------|-----------|-------|-------|-------------------|-------|-------|
|               | VAR1      | VAR2  | VAR3  | VAR1              | VAR2  | VAR3  |
| WT            | 46,55     | 20,25 | 33,19 | 45,55             | 21,25 | 33,2  |
| <i>nuc2-2</i> | 62,83     | 11,94 | 25,23 | 62,1              | 12,39 | 25,51 |
| BC4           | 44,86     | 23,52 | 31,61 | 44,9              | 23,78 | 31,33 |
| BC9           | 47,06     | 22,16 | 30,78 | 46,99             | 22,82 | 30,19 |

**Supplemental Figure 14.** PCR and LabChip experiments to determine relative abundance of rDNA variants in WT, *nuc2-2* and WT x *nuc2-2* backcrossed plants. Top, PCR reactions with 18 cycles amplification. Bottom, LabChip experiment using 24 cycles PCR reaction samples (undiluted or 1:4 fold diluted) to determine relative abundance (%) of rDNA variants

**Supplemental Table 1**

| N° signals/Nucleolus | WT<br><i>n</i> =63 | <i>nuc2-2</i><br><i>n</i> = 68 | <i>nuc2-2 gNUC2</i><br><i>n</i> =44 |
|----------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| ≤2                   | 100,00             | 86,76                          | 86,36                               |
| 3≥                   | 0,00               | 13,24                          | 13,64                               |
| Total                | 100,00             | 100,00                         | 100,00                              |

**Supplemental Table 1:** Percentage of nucleolus associated with ≤2 or ≥3 rDNA signals in WT, *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants. The *n* indicates number of nuclei analyzed in each sample.

**Supplemental Table 2**

| Oligo     | Sequence                   |
|-----------|----------------------------|
| 5'nuc2    | GACGAGGAACTGTCCCTATG       |
| 3'nuc2    | CTACTCTTCATCATTAAAGACCG    |
| 5'nuc2a   | GAACACATTGGCGAGAAATG       |
| 3'nuc2a   | GAACCGTCCACGTTTCAAGCG      |
| 5'nuc2b   | GTCAAGTGTCTAGAGAATCAC      |
| 3'nuc2b   | CAGCTAGGTTTACGAGAAGC       |
| 5'nuc2c   | CAGAAGCCAATCTCTCTCTAC      |
| 3'nuc2c   | GAAGCAGGTGTTTCAACCTG       |
| 5'nuc2q   | TTACTAGGCCGCGATG           |
| 3'nuc2q   | GTCTCACGATCTGTTGG          |
| 5'nuc1    | CCAAGAAGCCCGCAGCTGCTG      |
| 3'nuc1    | CTACTCGTCACCGAAGGTAGTC     |
| 5'elf1α   | CTAAGGATGGTCAGACCCG        |
| 3'elf1α   | CTTCAGGTATGAAGACACC        |
| 5'3ets    | GACAGACTTGTCCAAAACGCCACC   |
| 3'3ets    | CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT   |
| 5'flcq    | CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTGAG  |
| 3'flcq    | CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG      |
| 5'actineq | GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG    |
| 3'actineq | AACGACCTTAATCTTCATGCTGC    |
| 5'u3      | CGACCTTACTTGAACAAGATCTGTTG |
| 3'u3      | CTGTCAGACCGCCGTGCGA        |

|                     |                             |
|---------------------|-----------------------------|
| <i>tis</i>          | CCTCGTGCCGATATCCGATACCATCCC |
| <i>p</i>            | CCGATCACCACACTCATACGCCGAAC  |
| <i>5'-315</i>       | GGATATGATGYAATGTTTTGTGATYG  |
| <i>3'+243</i>       | CCCATTCTCCTCRACRATTCARC     |
| <i>5' -250</i>      | CAAGCAAGCCCATTCTCCTC        |
| <i>3'+250</i>       | CAACTAGACCATGAAAATC         |
| <i>5'18S</i>        | CGTAGTTGAACCTTGGGATG        |
| <i>3'18S</i>        | CACGACCCGGCCAATTA           |
| <i>5'25S</i>        | GCATCAGGTCTCCAAGGTG         |
| <i>3'25S</i>        | AGCCCTCAGAGCCAATC           |
| <i>5'its1</i>       | GTATCGGCATGCTCGGG           |
| <i>3'its1</i>       | TTCGTTTGCATGTTCTTGAC        |
| <i>5's</i>          | CTTTTCGGGCNTTTTNGTG         |
| <i>3's</i>          | CGAAAAGGTATCACATGCC         |
| <i>5'AtLINE</i>     | CCGATGGTGACCAAGAGTTT        |
| <i>3'AtLINE</i>     | TCAATGTCTGGAGACCTCCTC       |
| <i>5'AtSN1</i>      | TGTCTTGAAAGGATATTGGAAG      |
| <i>3'AtSN1</i>      | AAGTGGTGGTTGTACAAGCC        |
| <i>5NUC2intron</i>  | GATGATTGGATTYATTTTTGG       |
| <i>3NUC2intron</i>  | CAAAAACATACATAATCCCATC      |
| <i>5promNUC2</i>    | YTTGGGAGTYAAGTGTYTAG        |
| <i>3promNUC2</i>    | CTTRCCCATARATCCTRATC        |
| <i>bis3'ets_fwd</i> | TGGATAGTGAGAATAATAAGTGAAGAG |
| <i>bis3'ets_rev</i> | TCATCCATCATTTAATACTAATTCT   |

## Supplemental methods

### Immunostaining

4 week-old leaves were fixed in cold 4% formaldehyde in Tris buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaEDTA, 100 mM NaCl) for 20 minutes and wash for 2 x 10 minutes with cold Tris buffer. Leaves were then chopped with a razor blade in LB01 buffer (15 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM NaEDTA, 0.5 mM spermine, 80 mM KCl, 20 mM NaCl and 0.1% Triton X-100). The cell slurry was then filtered through a falcon cell strainer cap of 30µm. 5 µl of nuclei suspension were added to 10 µl of sorting buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20 and 5% sucrose) and spread on a polylysine slide. After air drying, samples were post-fixed in 2% formaldehyde in Phosphate Buffer (PBS) for 5 minutes and then washed twice with water before being air-dried.

In a moist chamber, 1X PBS + 0.5% triton were added directly on the slides for 15 min at RT, before being washed 3 times in 1X PBS for 5 min at RT. 1:500 dilution of purified α-At-NUC2 antibody (Pontvianne et al 2007), were applied on the slide in 1x PBS containing 3% BSA and 0.05% tween 20. After overnight at 4 °C, 3 washes in 1X PBS were performed, and the secondary antibody was added (Anti-Rabbit coupled with Alexa 488 from Invitrogen). After 3 hours at RT, the samples were washed 3 times in 1X PBS. Slides were then mounted in Vectashield at 1 µg/ml of DAPI and seal them with nail polish. Observation and imaging was performed using a confocal microscope LSM 700 from Zeiss.

### Bisulfite analysis of *Arabidopsis* *NUC2* sequences

For bisulfite analysis, 500 ng of DNA was treated using the Epiect Bisulfite Kit (Qiagen). For *NUC2* sequences, primers *5'promnuc2/3'promnuc2* and *5'nuc2intron/3'nuc2intron* were used to amplify the *NUC2* promoter and transcribed (14<sup>th</sup> intron) sequences. For 3'ETS rDNA sequences, primers *bis3ets\_fwd/bis3'ets\_rev* were used.

### EMSA assay:

Recombinant NUC1-His and NUC2-His proteins were purified from *E. coli* cells. *NUC2* promoter sequences used for ChIP experiments (-466/-210, -307/-38 and -

137/+141) were amplified by PCR, purified and end labeled using T4- polynucleotide kinase in presence of  $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ . For EMSA assay, equal amounts of NUC1-His and NUC2-His proteins were incubated for 30 minutes on ice with radioactive DNA probe in a buffer containing 10 mM Tris HCl pH7.5, 5% glycerol, 1mM DTT, 100 mM NaCl and 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Then nucleolin:DNA complex reactions were resolved on a 4% native polyacrylamide gel or 1% agarose gel and run in 0.5X TBE buffer. Complexes were analyzed using Phosphor Imager Technology.

### RNA-seq and bioinformatics analyses

Total RNA was extracted from three week-old *Arabidopsis* plant leaf tissues using TRIzol reagent (MRC, Inc.). Total RNA from three different pools of wild-type Col-0 or *nuc2-2* mutant plants was prepared independently to generate three biological replicates per sample. Sequencing was performed by the MGX facility using a Hiseq 2000 to generate 1X 51bp long reads. Illumina reads from non-stranded, polyA+ RNA-seq libraries were aligned to the *A. thaliana* TAIR10 annotated genome reference using Tophat2, Cufflinks, Cuffmerge and Cuffdiff (Langmead et al., 2009).

| Name          | Replicate number | Mapped   | Platform   | Facility | Source     |
|---------------|------------------|----------|------------|----------|------------|
| Col-0         | 1                | 43534749 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |
| Col-0         | 2                | 38143538 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |
| Col-0         | 3                | 45482777 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |
| <i>nuc2-2</i> | 1                | 39905299 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |
| <i>nuc2-2</i> | 2                | 44147023 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |
| <i>nuc2-2</i> | 3                | 40600021 | Hiseq 2000 | MGX      | This study |

**A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in *Arabidopsis***

Nathalie Durut, Mohamed Abou-Ellail, Frédéric Pontvianne, Sadhan Das, Hisae Kojima, Seiko Ukai, Anne de Bures, Pascale Comella, Sabine Nidelet, Stéphanie Rialle, Remy Merret, Manuel Echeverria, Philippe Bouvet, Kenzo Nakamura and Julio Sáez-Vásquez  
*Plant Cell* 2014;26;1330-1344; originally published online March 25, 2014;  
DOI 10.1105/tpc.114.123893

This information is current as of July 18, 2014

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Supplemental Data</b>        | <a href="http://www.plantcell.org/content/suppl/2014/03/14/tpc.114.123893.DC1.html">http://www.plantcell.org/content/suppl/2014/03/14/tpc.114.123893.DC1.html</a>   |
| <b>References</b>               | This article cites 44 articles, 22 of which can be accessed free at:<br><a href="http://www.plantcell.org/content/26/3/1330.full.html#ref-list-1">http://www.plantcell.org/content/26/3/1330.full.html#ref-list-1</a>         |
| <b>Permissions</b>              | <a href="https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&amp;issn=1532298X&amp;WT.mc_id=pd_hw1532298X">https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&amp;issn=1532298X&amp;WT.mc_id=pd_hw1532298X</a> |
| <b>eTOCs</b>                    | Sign up for eTOCs at:<br><a href="http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain">http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain</a>  |
| <b>CiteTrack Alerts</b>         | Sign up for CiteTrack Alerts at:<br><a href="http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain">http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain</a>   |
| <b>Subscription Information</b> | Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at:<br><a href="http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm">http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm</a>        |

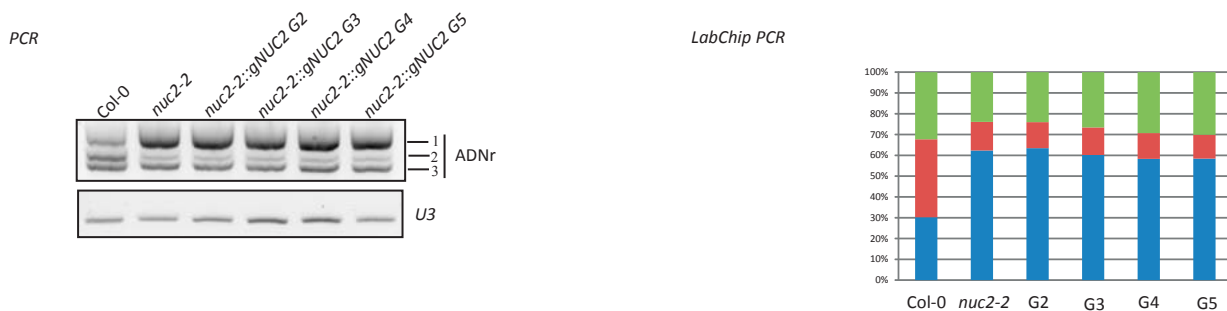
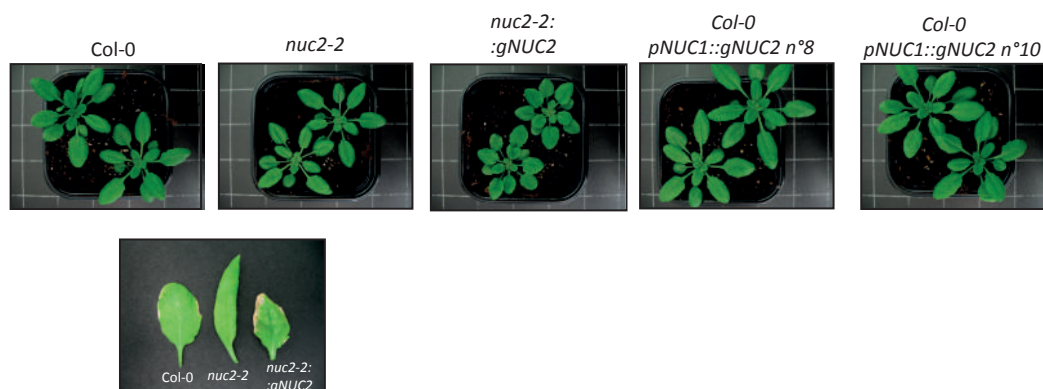
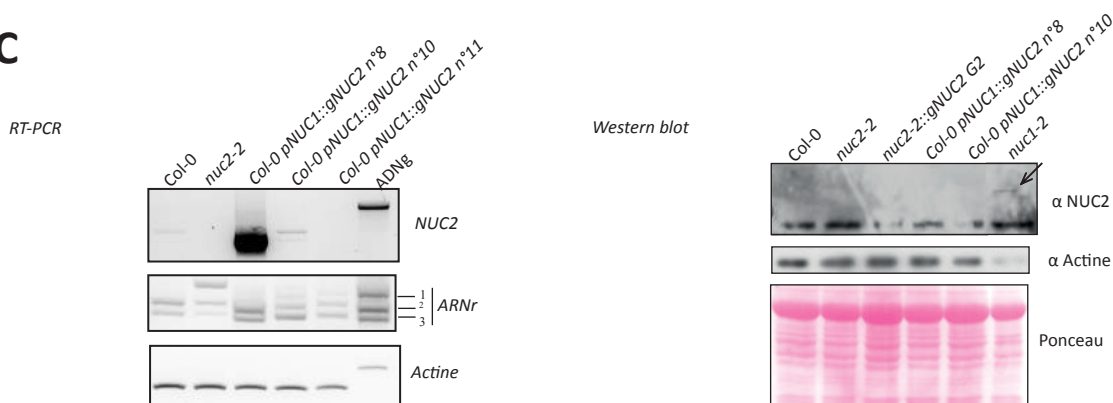
## B- Analyses complémentaires

### 1- Analyse générationnelle des lignées *nuc2-2::gNUC2*

Nous avons analysé cinq générations de lignées mutantes *nuc2-2* contenant la construction *pNUC2::gNUC2* (plante complémentée) afin de déterminer si l'introduction du gène *NUC2* avait un impact sur la stabilité des copies ADNr. Pour cela, nous avons analysé par PCR et PCR LabChip, le nombre de copie des différents variants ADNr présents dans chacune des 5 générations de plantes complémentées (Figure 19A). Les résultats obtenus n'indiquent aucune variation du nombre de copie entre les différentes générations ce qui suggère que ces lignées sont stables et que si la protéine *NUC2* participe bien à la mise en place de l'hétérochromatine, l'introduction du gène *NUC2* a alors permis d'empêcher d'éventuels évènements de recombinaison.

De manière surprenante, nous avons remarqué que les plantes complémentées présentaient un phénotype foliaire caractérisé par des feuilles de petite taille présentant une forme arrondie et légèrement ciselée sur la bordure (Figure 19B). Etant donné qu'une forte accumulation de transcrits *NUC2* est observée dans ces lignées complémentées (Cf. Résultats, Partie I.A), nous avons cherché à déterminer si ce phénotype n'était pas lié à la surexpression des transcrits *NUC2*. Pour cela, nous avons analysé des plantes sauvages Col-0 contenant la construction *pNUC1::gNUC2* permettant de sur exprimer le gène *NUC2* (Figure 19C). Par réaction RT-PCR, nous avons isolé une lignée présentant une forte accumulation de transcrits *NUC2* (n°8) et une deuxième ayant un niveau d'expression similaire à celui d'une plante sauvage (n°10). La troisième lignée (n°11) a été écartée de notre étude en raison de l'absence de transcrits. Cependant, nous n'avons pas réussi à détecter la protéine ni dans les plantes contenant la construction *pNUC1::gNUC2*, ni dans les lignées complémentées et sauvages (Figure 19 C, Western blot). De ce fait, nous ne pouvons pas dire si la protéine est sur exprimée ou bien si elle est présente en quantité similaire à celle du Col-0. Néanmoins, la protéine *NUC2* est bien détectée dans le mutant *nuc1-2*, ce qui nous permet d'éliminer d'éventuels problèmes techniques pouvant expliquer l'absence de la protéine.

Par ailleurs, le profil d'expression des gènes d'ARNr observé est similaire entre les plantes sauvages Col-0 et Col-0 *pNUC1::gNUC2* ce qui indique que la sur expression des

**A****B****C**

**Figure 19** : Analyse des plantes complémentées *nuc2-2::gNuc2* et des lignées sur expresseur de la *NUC2*

**A** : A gauche : Analyse PCR des gènes d'ARNr à l'aide des amorces 5'3ets/3'ets à partir de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNuc2* sur plusieurs générations (G2 à G5). L'amplification du gène *U3* est utilisée comme témoin de charge. A droite : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des variants VAR1 (bleu), VAR2 (rouge) et VAR3 (vert) dans les plantes Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNuc2* sur plusieurs générations (G2 à G5). L'histogramme a été obtenu suite à l'amplification de la région 3'ETS des ADNr et à la quantification de chacun des signaux à l'aide du système LabChip. **B** : Photographies de plantes de 4 semaines de Col-0, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNuc2* et Col-0 p*NUC1::gNuc2*. **C** : A gauche : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *NUC2* et d'ARNr dans les plantes de 15j de Col-0, *nuc2-2* et Col-0 p*NUC1::gNuc2*. L'amplification des transcrits *EF1 $\alpha$*  est utilisée comme témoin de charge. A droite : Analyse par Western blot avec l'anticorps  $\alpha$ -*NUC2* dans les plantes de 15j de Col-0, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNuc2*, *nuc1-2* et Col-0 p*NUC1::gNuc2*. La flèche indique la présence du signal correspondant à la protéine *NUC2*. L'anticorps actine et la coloration rouge ponceau sont utilisées comme témoin de charge.



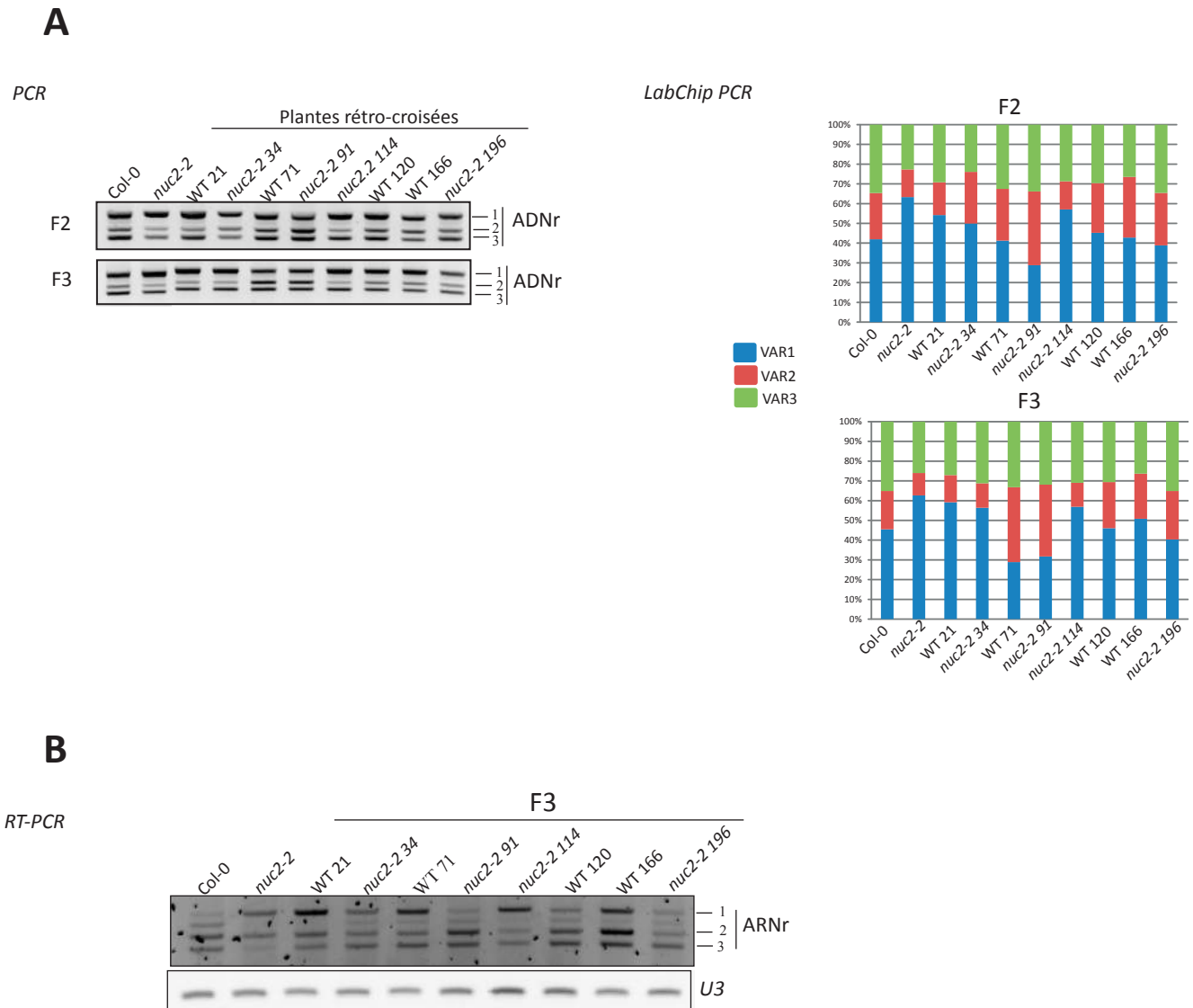
transcrits *NUC2* n'affecte pas l'expression des gènes d'ARNr. Ainsi, l'accumulation des transcrits *VAR1* observée dans les plantes complémentées n'est probablement pas liée à la sur expression des transcrits *NUC2*. D'un point de vue phénotypique, aucune modification morphologique des feuilles n'est observée dans les plantes Col-0 *pNUC1::gNUC2* ce qui indique que le phénotype observé dans les plantes complémentées n'est également pas associé à la sur expression de transcrits *NUC2* (Figure 19B). Ce phénotype pourrait simplement s'expliquer par l'insertion de la construction *pNUC2::gNUC2*, au sein des mutants *nuc2-2*, dans une région génomique contenant un gène impliqué dans la morphogénèse de la feuille, mais cela reste à vérifier.

## 2- Analyses générationnelles des lignées rétro-croisées

Nous avons effectué des croisements entre les plantes sauvages Col-0 et les plantes mutantes *nuc2-2* en utilisant le pollen des mutants *nuc2-2* (*nuc2/Col-0*) puis celui des plantes sauvages (*Col-0/nuc2*). Les graines des siliques provenant des fleurs pollinisées ont été récupérées (F1) puis semées afin d'obtenir la deuxième génération (F2). Les plantes F1, toutes hétérozygotes pour le gène *NUC2*, autrement dit possédant un allèle provenant de la plante sauvage et un allèle provenant du mutant *nuc2-2*, ont été précédemment présentées dans l'article.

En parallèle, nous avons continué l'analyse des générations suivantes, l'objectif étant de déterminer si la proportion des variants ADNr varie dans les plantes devenues mutantes (homozygotes) pour le gène *NUC2* (Figure 20).

Dans la deuxième génération (F2), nous avons pu observer que la ségrégation du gène *NUC2* suit la loi mendélienne avec  $\frac{1}{4}$  de plantes sauvages (WT) Col-0,  $\frac{1}{4}$  de plantes mutantes *nuc2-2* et  $\frac{1}{2}$  de plantes hétérozygotes. En revanche, il est important de noter que les gènes d'ARNr ne ségrégent pas selon la loi mendélienne et donc, qu'il est extrêmement difficile d'estimer la répartition des copies *VAR1*, 2 et 3 provenant des plantes sauvages ou bien mutantes. De ce fait, nous avons pu observer différents profils de répartition des variants d'ADNr au sein de la génération F2 entre les plantes Col-0 et *nuc2* (Figure 20A). Dans la génération F3, nous espérons observer des profils différents de celui observé dans les plantes mutantes *nuc2-2* en F2 afin de mettre en évidence une instabilité génomique des



**Figure 20 :** Analyses des différentes générations de plantes rétro-croisées Col-0 x *nuc2*

**A :** A gauche : Analyse par amplification PCR des gènes d'ARNr à l'aide des amorces 5'3ets/3'3ets à partir de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et des différentes générations de plantes rétro-croisées (F2 et F3) *nuc2*/Col-0 (21, 34, 71 et 91) et Col-0/*nuc2* (114, 120, 166 et 196) redevenues sauvages (21, 71, 120 et 166) ou mutantes *nuc2* (34, 91, 114 et 196). A droite : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des variants VAR1 (bleu), VAR2 (rouge) et VAR3 (vert) dans les plantes Col-0, *nuc2-2*, *nuc2*/Col-0 et Col-0/*nuc2*. L'histogramme a été obtenu suite à l'amplification de la région 3'ETS des ADNr et à la quantification de chacun des signaux à l'aide du LabChip système. **B :** Analyse RT-PCR des gènes d'ARNr de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2*, *nuc2*/Col-0 et Col-0/*nuc2* en génération F3. L'amplification des transcrits *U3* est utilisée comme témoin de charge.

gènes d'ARNr en absence du gène *NUC2*. Les résultats présentés sur la figure 20A montrent que le mutant *nuc2-2* n°34 présente une répartition des variants différente de celle observée dans les mutants en génération F2. En effet, dans la génération F3, le nombre de copies des variants est de 55% pour le *VAR1*, 12% pour le *VAR2* et 33% pour le *VAR3* contre 50% pour la *VAR1*, 25% pour le *VAR2* et 25% pour le *VAR3* en F2. Néanmoins, chez certains individus sauvages, la répartition des ADNr est également affectée (par exemple dans les plantes n°71 et 166). Ainsi, il est difficile de conclure sur ces résultats. Peut-être faut-il attendre plusieurs générations pour observer de réels changements. Ces résultats étant préliminaires, des répliquas biologiques sont nécessaires afin de vérifier les données précédentes. Par ailleurs, en parallèle, il serait intéressant de regarder si la ré obtention de mutants *nuc2* à partir des hétérozygotes F2 entraîne de nouveaux réarrangements, et si ces derniers sont identiques à ceux observés dans les mutants *nuc2-2* ayant été utilisés pour faire les croisements. Ceci nous permettrait alors de confirmer d'une part, une instabilité génomique en absence de la protéine *NUC2* et d'autre part de déterminer si cette instabilité est spécifique à une population de gènes d'ARNr.

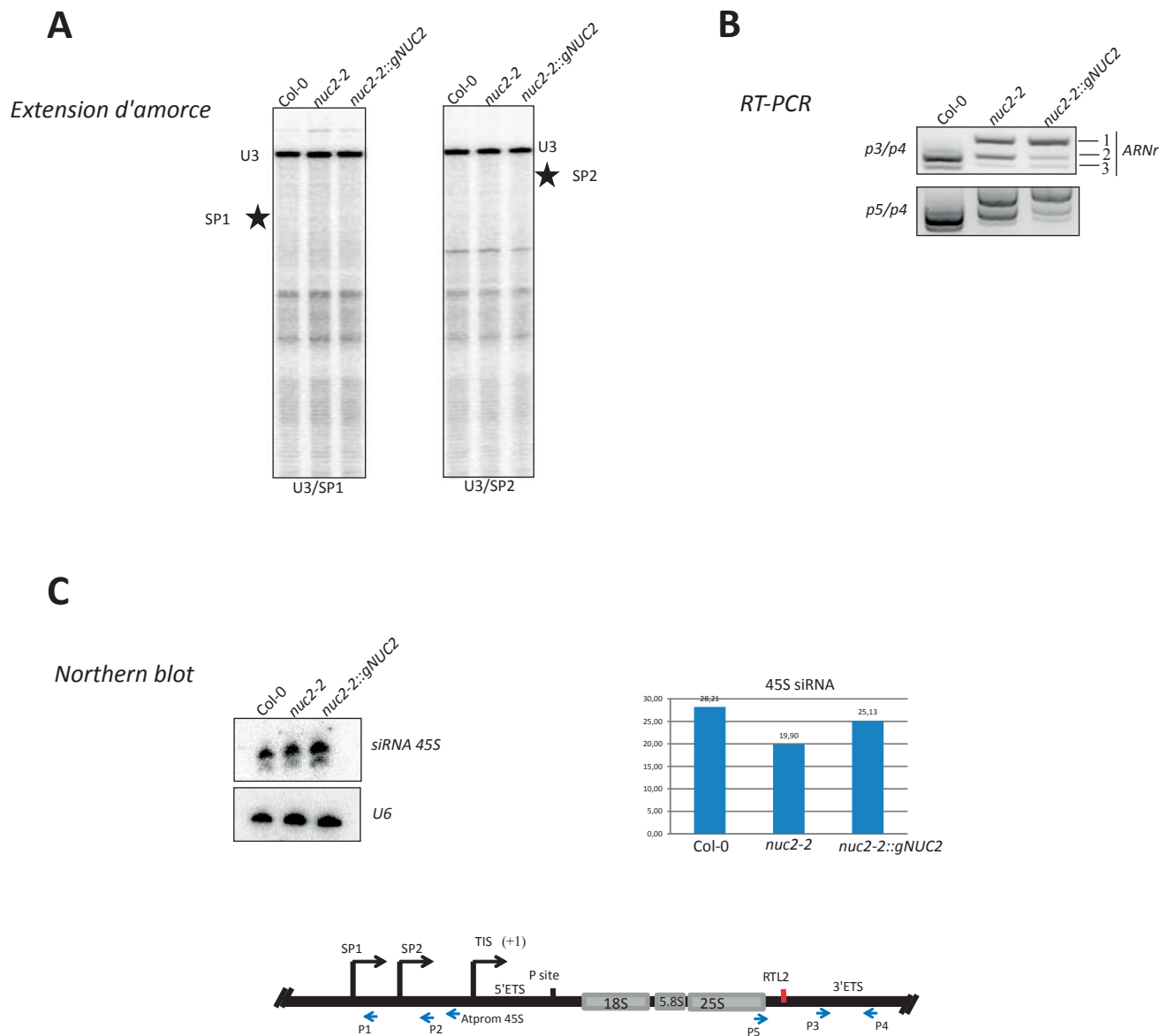
Nous avons également analysé l'expression des gènes d'ARNr au sein de ces lignées rétro-croisées. Nous avons pu remarquer que certains mutants *nuc2-2*, dont les plantes n° 91 et 196, ayant un nombre de copies *VAR1* similaire (n°196) ou réduits (n°91) à ceux observés dans les plantes sauvages, n'expriment pas ou quasiment pas le *VAR1* (Figure 20B) ce qui suggère que l'expression du *VAR1* n'est probablement pas liée à l'absence de la protéine *NUC2*. De la même manière, dans certaines plantes sauvages (par exemple la lignée n°71 F3), le *VAR1* est exprimé alors que le nombre de copies *VAR1* est inférieur à celui observé dans les plantes sauvages de référence ayant servies pour générer les croisements. Ainsi, il est difficile de dire si l'absence de la protéine *NUC2* affecte directement l'expression des transcrits *VAR1*. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les profils d'expression des gènes d'ARNr observés ne sont pas déterminés par le nombre de copies de chaque variant mais plutôt par leur localisation sur les NORs (II inactif ou IV actif) ce qui permet d'expliquer que certains variants peu représentés soient plus fortement exprimés que ceux majoritairement représentés.

### 3- Analyses moléculaires complémentaires

Nous avons pu voir que des transcrits *VAR1* s'accumulent dans le mutant *nuc2-2*. Cependant, les données obtenues suite à l'extension d'amorce n'ont révélé aucun changement dans le taux de transcription initiée à partir du TIS (Cf. Résultats, Partie I.A). Nous avons alors décidé de vérifier si ces transcrits *VAR1* provenaient d'une transcription localisée en amont, dans les séquences inter géniques. Pour cela, nous avons réalisé une extension d'amorce à l'aide d'amorces ciblant les précurseurs provenant des promoteurs espaceurs alternatifs SP1 et SP2 (Figure 21A). Toutefois, aucun signal n'a été détecté à la taille attendue de 162 pb pour le promoteur SP1 et 185 pb pour le promoteur SP2. Ces résultats suggèrent donc que les transcrits *VAR1* ne sont pas initiés à partir des promoteurs espaceurs dans les plantes mutantes *nuc2-2*. Cependant, il n'est pas impossible que ces transcrits soient générés à partir de séquences promotrices localisées entre les promoteurs espaceurs et le TIS.

D'autre part, l'accumulation du *VAR1* dans le mutant *nuc2-2* pourrait également être la conséquence d'un défaut de maturation au niveau de la région polymorphique 3'ETS. Afin de déterminer si ces transcrits sont des produits de dégradation ou bien des précurseurs non maturés, nous avons réalisé une RT-PCR ciblant l'ARNr 25S et la région 3'ETS en aval du site de coupure de la protéine RTL2 (Figure 21B). Une amplification du *VAR1* est détectée dans les plantes mutantes *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* mais pas dans les plantes sauvages ce qui indique que ces transcrits correspondent à des précurseurs et non à des produits clivés.

La région 5'ETS des gènes d'ARNr est hyper méthylée dans le mutant *nuc2-2*. La méthylation de l'ADN est généralement guidée par des petits ARN appelés siRNA (Zhang et al. 2013). Nous avons donc décidé de vérifier le taux de siRNA dans les mutants *nuc2-2*. Pour cela, nous avons réalisé un Northern blot avec pour sonde une séquence d'ADN ciblant la région promotrice de l'ADN. Les résultats obtenus révèlent une légère diminution (~8%) des petits ARN dans le mutant *nuc2-2* par rapport aux plantes sauvages (Figure 21C). Ces données suggèrent donc que la variation de méthylation n'est pas associée à une



**Figure 21** : Expression des gènes d'ARNr

**A** : Réaction d'extension d'amorce à partir d'ARN totaux de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* et des amorces *p1* (SP1) et *p2* (SP2). Les étoiles indiquent la taille attendue des transcrits générés à partir des promoteurs espaceurs SP1 et SP2. L'amorce U3 cible le U3 *snoRNA* et est utilisé comme témoin de charge. **B** : Analyse RT-PCR de l'expression des gènes d'ARNr à partir de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* à l'aide des amorces *p3/p4* (5'3ets/3'3ets) et *p5/p4* (5'25S/3'3ets). **C** : Northern blot réalisé avec la sonde *At45Sprom*, ciblant le promoteur des ADNr, à partir d'extraits d'ARN totaux de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2*. L'histogramme représente la quantité de siRNA normalisée par rapport à U6.

Diagramme représentant une unité génique d'ADNr 45S avec les espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et la séquence codant les 3 ARNr (18S, 5.8S et 25S en gris). Les sites d'initiation de la transcription (TIS), les promoteurs espaceurs (SP1 et SP2) ainsi que les sites de maturation (P et RTL2) sont également représentés. Les amorces utilisées pour les réactions d'extension d'amorce, de RT-PCR et pour le Northern blot sont indiquées.

augmentation des siARN. Cette analyse n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il est nécessaire de faire un réplica biologique.

## Partie II : Le gène *NUC2* est induit en réponse au stress

---

Deux gènes de la nucléoline ont été identifiés chez *A. thaliana* : *NUC1* et *NUC2*. Précédemment, nous avons montré que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr. Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à mieux caractériser la fonction du gène *NUC2* au sein de la plante. Chez les animaux, la nucléoline est une protéine multifonctionnelle intervenant dans la régulation de plusieurs processus cellulaires notamment en réponse au stress (Daniely and Borowiec 2000; Daniely et al. 2002; Kim et al. 2005; Jiang et al. 2010a). Chez les plantes, des travaux ont mis en évidence la sur expression de la nucléoline en réponse à des changements environnementaux tels que la salinité, la gravité ou encore la lumière (Tong et al. 1997; Sobol et al. 2004; Jiang et al. 2010a; Sripinyowanich et al. 2013). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au potentiel rôle des protéines NUC1 et NUC2 dans la réponse au stress.

Au cours de ce travail, nous avons montré que le promoteur du gène *NUC2* est fortement induit en réponse au stress thermique et que cette induction est liée à la présence d'un élément *HSE* présent dans le promoteur du gène. Par ailleurs, des éléments de réponse à la sécheresse ou encore aux hormones, impliquées dans la voie de signalisation aux pathogènes, ont été identifiés dans le promoteur ce qui indique que le gène *NUC2* pourrait être impliqué dans la réponse à différents stress. De manière intéressante, ces éléments n'ont pas été détectés au sein du promoteur du gène *NUC1* ce qui pourrait suggérer l'apparition de potentielles nouvelles activités fonctionnelles au sein du gène dupliqué *NUC2*. L'ensemble de ces données est présenté sous la forme d'un article actuellement en cours de préparation.

## A- Article en préparation

**“*NUC2* is a stress inducible gene”**



## ***NUC2* is a stress inducible gene**

\*Abou-Elail M. <sup>(1,2)</sup>, \*Durut N. <sup>(1,2)</sup>, Jobet E. <sup>(1,2)</sup>, Laudie M. <sup>(1,2)</sup>, Cooke R. <sup>(1,2)</sup> and § Sáez-Vásquez J <sup>(1,2)</sup>.

(1)CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, 66860, Perpignan, France.

(2)Univ. Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, F-66860, Perpignan, France.

\*Equally contributed

§To whom correspondence should be addressed

Tel: +33 4 30 19 81 18

E-mail: [saez@univ-perp.fr](mailto:saez@univ-perp.fr)

Present address of MAE:

National Research Centre, El-Dokki, El-Behoose St.,Cairo, Egypt.

### **Abstract**

Nucleolus plays a central role in stress response in eukaryotic cells. Nucleolin protein is a major non ribosomal protein in the nucleolus. It is required for transcription and processing of pre-rRNA and the assembly of ribosome. In animal and yeast cells, nucleolin protein is encoded by a single gene. Its activity is controlled at transcriptional and post transcriptional level during cell growth and differentiation or in response to cellular stresses. In contrast, all plant species encode at least two nucleolin protein genes. Here, we report that the duplicated nucleolin gene from *Arabidopsis thaliana* (*NUC2*) contains several *cis*-acting elements related to biotic and abiotic stress responses. We characterized a Heat Shock

Element (*HSE*) and demonstrate that *NUC2* promoter activity increases and transcripts and protein accumulate at 37°C.

## Introduction

Nucleolin is a multi-functional protein involved in DNA metabolism (De et al. 2006; Kobayashi et al. 2012; Goldstein et al. 2013), nucleolar localization of telomerase (Khurts et al. 2004) and chromatin remodeling (Angelov et al. 2006; Mongelard and Bouvet 2007). Remarkably, nucleolin activity has also been associated to multiple biotic and abiotic stress conditions in animal, yeast and plants. In animal cells, nucleolin interacts with viruses and enteropathogenic bacteria (reviewed in (Masiuk 2010)). In DNA replication, heat stress induces nucleolin delocalization from nucleolus to nucleoplasm *via* its interaction with p53 protein (Daniely et al. 2002). In the nucleoplasm, nucleolin interacts with RPA protein (Replication Protein A) to block DNA replication (Daniely and Borowiec 2000; Kim et al. 2005). Moreover, the oxidative stress like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces down regulation of nucleolin gene expression, increases protein cleavage and declines stability and half-life of the protein. Additionally, overexpression of nucleolin inhibits apoptosis whereas nucleolin deficiency increases apoptosis (Jiang et al. 2010a; Zhang et al. 2010a). In response to genotoxic stress, Heat Shock Protein HSP70 is induced and accumulates in nucleolus to stabilize nucleolin and decreases apoptosis (Jiang et al. 2010a; Wang et al. 2012). In the carp fish, low temperature induces nucleolin expression (Alvarez et al. 2004). Interestingly, the carp genome encodes at least three nucleolin protein genes, however it is not known which gene is differentially expressed (Quezada et al. 2006).

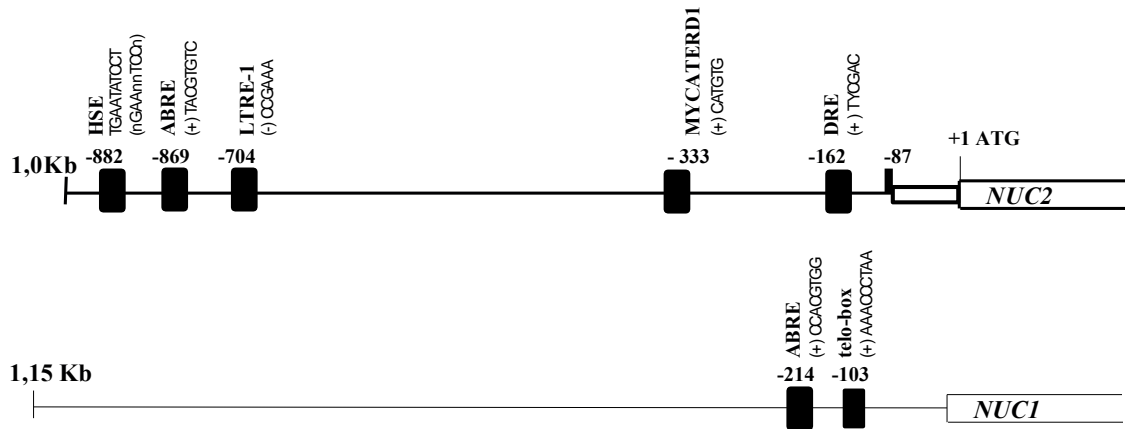
In plants, less information is available concerning the role of nucleolin in response to stress. It has only been shown that nucleolin expression is regulated in response to altered gravity conditions (Sobol et al. 2007), light stimulation (Tong et al. 1997) or salt stress (Sripinyowanich et al. 2013). Moreover, overexpression of *Arabidopsis thaliana* NUC1 protein in *Nicotiana benthamiana* reduces the accumulation of tombusvirus RNA and inhibits the *in vitro* activity of the tombusvirus replicase (Jiang et al. 2010b).

In *Arabidopsis thaliana*, two genes encode nucleolin protein. Previously, it was reported that nucleolin protein NUC1, is a constitutively expressed gene required for nucleolus structure, rDNA chromatin organization and rRNA gene expression (Kojima et al. 2007; Petricka and Nelson 2007; Pontvianne et al. 2007; Pontvianne et al. 2010; Abou-Ellail et al. 2011). *NUC2* gene expression is significantly lower compared to *NUC1* and recently, it was shown that NUC1 protein controls the expression of *NUC2* gene (Kojima et al. 2007; Pontvianne et al. 2007; Durut et al. 2014). Like NUC1, NUC2 is involved in rDNA chromatin organization and rRNA expression. However, this protein seems to be associated with rDNA heterochromatin establishment and repression of rRNA gene expression (Durut et al. 2014). Simultaneous mutation of *NUC1* and *NUC2* genes is seedling lethal indicating that both nucleolin proteins are required for plant growth and development (Durut et al. 2014).

Plants are sessile organisms that possess a second nucleolin gene. This second gene may have new functions under specific plants development and environmental conditions. In this context, we would like to get more insight in the physiological significance of *NUC2* gene in *Arabidopsis*. For this, we performed functional analysis of the *NUC2* gene promoter sequences and studied its expression in response to environmental conditions.

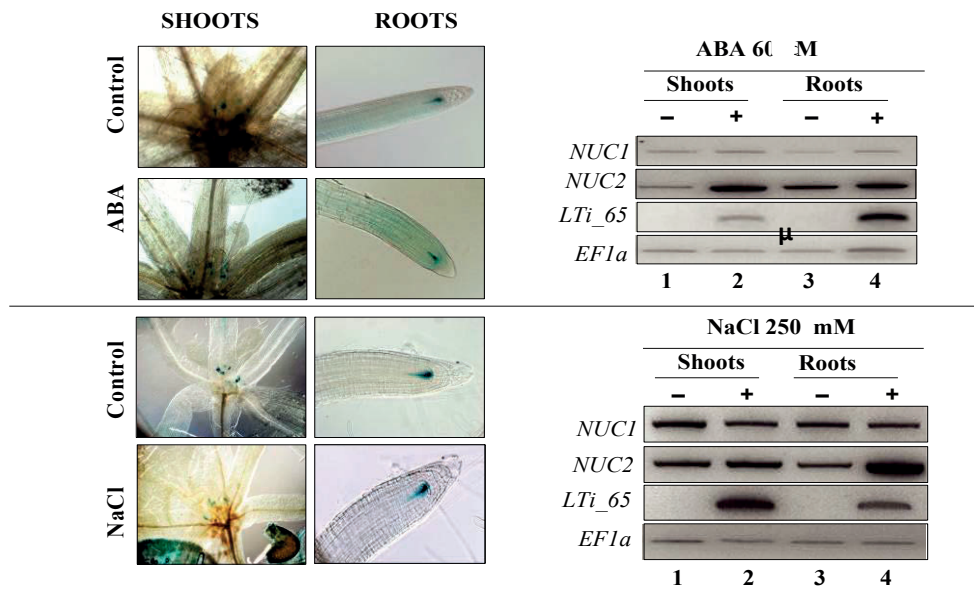
## Results and Discussion

The 1Kb promoter of *NUC2* gene, (located upstream of starting ATG), contains 5 *cis*-acting elements (Figure 1): ABA responsive element (*ABRE*), Low Temperature Responsive Element (*LTRE-1*), Dehydration-Responsive Elements (*MYCATRD1* and *DRE*) and Heat Shock Element (*HSE*). These elements might regulate *NUC2* gene expression in response to stress conditions. Excepting *ABRE*, these *cis*-acting elements are detected in *NUC2* but not in *NUC1* promoter sequences from *Arabidopsis thaliana*. In contrast, the telo-box, which is associated to ribosome biogenesis and translation of protein genes (Tremousaygue et al. 2003), is detected in *NUC1* but not in *NUC2* sequences. Several W boxes, binding sites of WRKY transcription factors involved in developmental and biotic and abiotic stress response, are also identified in both *NUC2* and *NUC1* promoter sequences (not shown).



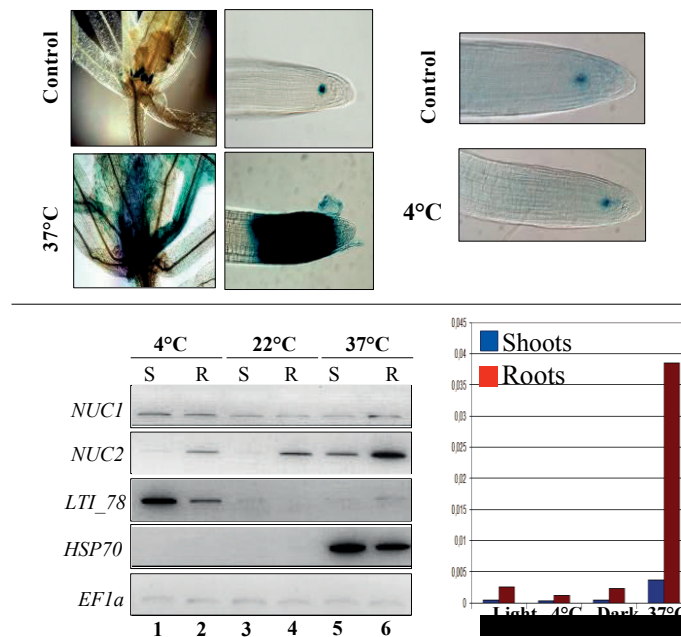
**Figure 1:** *Cis*-acting elements in *NUC2* and *NUC1* sequences. The site “PLACE Web Signal Scan” (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) and visual search were used for the identification of *Cis*-acting elements in 1 kb upstream sequence from the starting ATG of the *NUC1* and *NUC2* genes.

Despite the presence of *DRE*, *MYCATRD22* and *ABRE* elements, treatments with ABA (Abscisic acid) or NaCl do not induce *NUC2* promoter activity neither in shoots or in roots of plants transformed with a *pNUC2:GUS* promoter construct (Figure 2). This could be explained first, because our treatments are not sufficient to induce activation of these *cis*-acting elements or second, because these elements respond only at specific developmental stages. Nevertheless, accumulation of *NUC2* transcripts is detected after treatment with ABA and NaCl. So, it is possible that, in presence of ABA or NaCl, *NUC2* transcripts are stabilized and then accumulate. However, it is relevant to mention that application of ABA suppresses rDNA decondensation (Zhang et al. 2012) and that *NUC2* is likely required for rDNA condensation during seed germination (Durut et al. 2014).



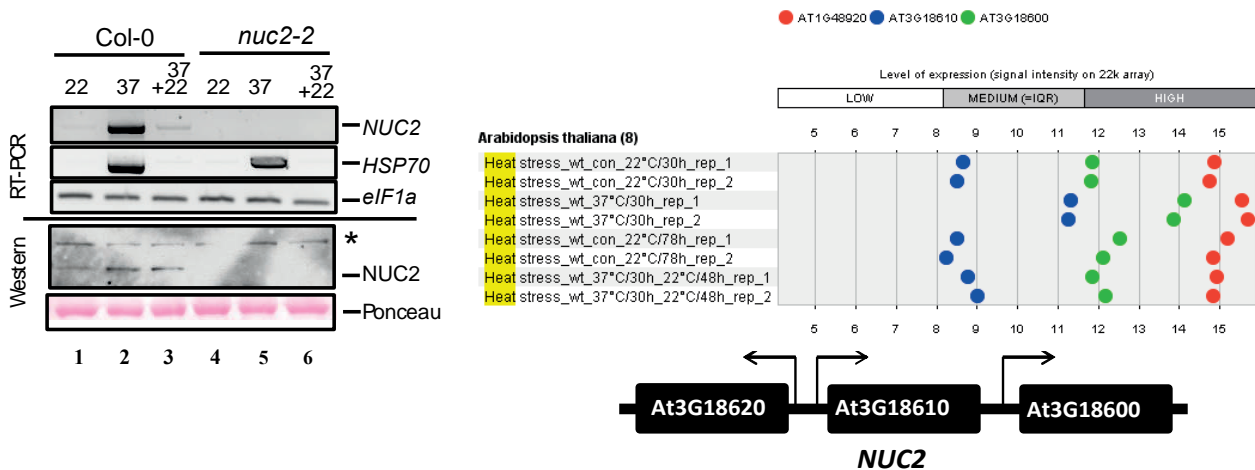
**Figure 2:** Expression of *NUC2* gene after NaCl and ABA treatments. 15 days old *A. thaliana* seedlings were treated for 4 hours with 60 μM ABA or 250 mM NaCl to study *NUC2* promoter activity and/or transcripts accumulation. Left panels: *NUC2* promoter activity after treatment with ABA or NaCl in shoots and roots. Right panels: RT-PCR analysis of *NUC1* and *NUC2* transcripts in shoots (Lanes 1 and 2) and roots (Lanes 3 and 4). The *pNUC2:GUS* construct is described in (Durut et al. 2014). Primers 5'*lTi65*/3'*lTi65* were used to amplify specific *LTI65* transcripts, which accumulate in response to ABA and NaCl treatments (Nordin et al. 1993). Amplification of *EF1α* transcripts was used as a PCR control to verify similar amount of cDNA in each sample.

In agreement with the presence of an *HSE cis*-element, the *NUC2* promoter activity is induced and transcripts accumulate in shoots and roots from plants treated 24h at 37° in darkness (Figure 3). qPCR analysis shows up to 8-fold increased amount of *NUC2* transcripts in roots from heat treated plants compared to control plants. In contrast and regardless of the presence of a potential *LTRE*, the *NUC2* promoter activity is not affected after 24h at 4°C. Only a slight reduction of *NUC2* transcripts is observed after the cold treatment.



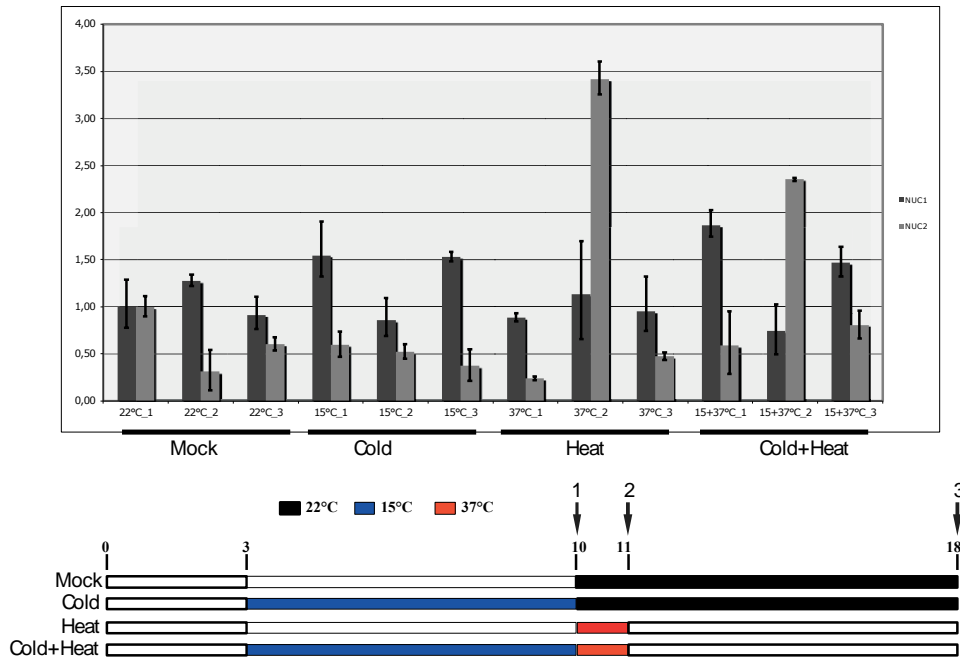
**Figure 3:** Expression of *NUC2* gene at 37°C and 4°C. 15 days old *A. thaliana* seeds were grown at 22°C in MS medium and transferred in darkness, for 24h at 37°C or 4°C to study *NUC2* promoter activity and transcripts accumulation. Top panel: *NUC2* promoter activity in shoots and roots after 24h at 37°C or 4°C. Lower panel: RT-PCR analysis of *NUC1* and *NUC2* transcripts at 4°C, 22°C and 37°C in shoots (Lanes 1, 3 and 5) and roots (Lanes 2, 4 and 6). RT-qPCR was also performed to determine relative amount of *NUC2* transcripts in treated and non-treated plants and to control *NUC2* transcripts level in light/dark conditions. Primers 5'*lti78*/3'*lti78* and 5'*hsp70*/3'*hsp70* were used to amplify specific *LTI78* and *HSP70* transcripts, which accumulate in response to cold and heat treatments. Amplification of *EF1α* transcripts was used as a PCR control to verify similar amount of cDNA in each sample.

The temperature treatments described above were performed under dark conditions. Then, we decided to study *NUC2* gene response to heat stress under continuous light (Figure 4). Accumulation of *NUC2* transcripts and *NUC2* protein is also observed after 24h at 37°C. Then, after returning the plants to room temperature, the level of *NUC2* transcripts is restored to untreated plants while the level of *NUC2* protein remains sensibly higher. Interestingly, the protein gene located downstream of *NUC2* encodes also a nucleolar protein which is also induced by heat stress. In contrast, the protein gene located upstream and near to *HSE* is not induced by heat, indicating that *HSE* element is a *NUC2* regulatory element.



**Figure 4:** *NUC2* expression at 37°C under continuous light conditions. 15 days old *A. thaliana* seeds were grown under continuous light at 22°C in MS medium, then transferred at 37°C for 24h and returned at 22°C for 48h. Left panel: RT-PCR and Western blot analysis of *NUC2* transcripts and protein in WT (Lanes 1-3) and *nuc2-2* (Lanes 4-6) plants. *nuc2-2* mutant plants were described previously in (Durut et al. 2014) and were used here to control specific detection of *NUC2* transcripts and protein. Amplification of *HSP70* and *EF1a* transcripts was performed to verify heat treatment conditions and similar amount of cDNA respectively in each sample. Ponceau S coloration is used to verify similar amount of proteins in each sample. The asterisk, in panel *NUC2*, shows a cross reacting protein band that reveals similar amount of protein in all samples. Right panel: Microarray results (<https://www.genevestigator.com/gv/>) showing expression of *NUC2*, *At3g18600* and *At3g18620* gene at 37°C/30h and 22°C/48h following heat treatment. Expression of *NUC1* is also shown to compare relative fold induction in response to heat.

Cold treatment does not affect *NUC2* gene expression. However, the *NUC2* expression after heat stress (24h/37°C) decreases in plants previously maintained 1 week at 15°C (Figure 5). In fact, cold-heat treated plants show a decrease of approximately 1.5 fold amount of *NUC2* transcripts compared with heat treated plants. After returning plants at 22°C, *NUC2* transcripts level is restored to that observed before treatment. Interestingly, 1 week at 15°C induces accumulation of *NUC1* transcripts including in plants heat treated for 1 day. *NUC1* transcripts level is restored after returning plants at 22°C. These observations highlight antagonistic expression patterns of *NUC1* and *NUC2* genes in response to high or low temperature conditions.



**Figure 5:** Prolonged low temperature inhibits partially *NUC2* gene induction at 37°C. Under continuous light conditions, 3 days old germinating seedling were transferred to 15°C and/or maintained at 22°C for 7 days prior treatment at 37°C for 24h. Times indicated in the scheme (1-3) correspond to collection of samples to study *NUC2* and *NUC1* gene expression by RT-qPCR.

## Conclusion

*NUC2* is a heat stress inducible gene. So far we do not know if the *HSE* element is exclusively responsible of higher expression of *NUC2* in the response to heat stress. Remarkably, ABA and SA (Salicylic Acid) signaling are activated in response to high temperature (Larkindale et al. 2005; Kotak et al. 2007; Zinn et al. 2010) whereas heat response depends also on dehydration-responsive element binding proteins 2A (Sakuma et al. 2006). Thus, *HSE*, *ABA* and *DRE*, *MYCATRD22* elements might contribute all together to control *NUC2* gene expression in response to heat stress.

The *cis*-acting elements found in *NUC2* promoter could be DNA binding sites for one or more *trans*-acting factors, which could regulate gene expression under heat stress conditions (Liu et al. 2006b). However, it is important to mention that heat stress might also



induce transcription activation through epigenetic or nucleosome remodeling (Pecinka et al. 2010; Tittel-Elmer et al. 2010; Cavrak et al. 2014). *NUC2* gene expression is partially controlled by methylation of DNA coding sequences (Durut et al. 2014), but in this case, our heat treatment conditions seem to not affect methylation state of *NUC2* coding sequences (data not shown). So we propose that *NUC2* gene response to heat is mainly controlled by *trans*-acting factors. It was previously demonstrated that *NUC1* controls negatively *NUC2* gene expression (Pontvianne et al. 2007). Consequently, we can expect that *NUC1* gene expression and/or post translational modifications of *NUC1* protein might also affect *NUC2* gene expression. Interestingly, long exposure at low temperatures induces up regulation of *NUC1* gene expression and affects also heat stress responsiveness of *NUC2*.

Plants with disrupted *NUC2* gene show altered expression of several protein genes related with biotic and abiotic stress ([www.bar.utoronto.ca/welcome.htm](http://www.bar.utoronto.ca/welcome.htm) and [www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/)). However, we do not see major plant growth or development defects in *nuc2* plants treated at 37°C for 24h, neither in plants maintained previously at low temperature before heat treatment. In the future, it would be interesting to study the impact of *NUC2* overexpression in response to heat stress. Overexpression of *NUC1* in *Nicotiana benthamiana* reduces the accumulation of RNA tombusvirus and inhibits the *in vitro* activity of the tombusvirus replicase (Jiang et al. 2010b). Similarly, overexpression of *O. sativa NUC1* in rice plants increases salt stress tolerance (Sripinyowanich et al. 2013).

In *A. thaliana*, the two nucleolin genes seem to be differentially regulated at transcriptional level, through specific *NUC1* and *NUC2 cis*-acting elements, including *HSE*, *ABRE*, *LTRE* and maybe others not yet identified. *NUC2* up regulation in conditions that activate these *cis*-elements is probably required for plant new activities in response to stress. *NUC1* and *NUC2* proteins are structurally similar but the amino acid sequence differs considerably. Interestingly, *in silico* analysis using the Web site BAR ([http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis\\_interactions\\_viewer.cgi#stats](http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi#stats)) shows that *NUC1* and *NUC2* proteins might interact with specific factors. This suggests that *NUC2* might play specific roles under stressful conditions.

Under unfavorable conditions, plants do not grow and/or develop normally but rather adapt their genetic program to resist or tolerate stressful environmental conditions, likely controlling their protein synthesis capacity. In contrast to *NUC1*, *NUC2* protein expression and activity is correlated with changes in rDNA methylation and repression of rRNA genes during germination (Durut et al. 2014). Thus, up regulation of *NUC2* under heat stress might affect negatively rRNA synthesis and consequently constrains ribosome biogenesis. Determining the global impact on nucleolus dynamics and on rRNA gene expression in response to temperature stress conditions should be the next challenge of this work.

## Material and Methods

### Plant growth conditions

All lines were derived from *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ecotype. Seeds were first sown on Murashige and Skoog medium (4.7 g/l MS, 0.5 g/l MES, 10 g/l sucrose, 5g/l Plant agar) and left 2 days at 4°C to synchronize. Plants were then grown under continuous light (MS plants). For ABA and NaCl treatments, 15 days –old plants were transferred for 4 hours to liquid MS medium containing either 60 µM ABA or 250 mM NaCl (Figure 2). For temperature conditions, control and treated plant samples were wrapped in aluminium foil and placed at 4°C or 37°C for 24 hours (Figure 3) or transferred to growth chamber at 15°C or 37°C under continuous light (see Figure 4-5 for time conditions).

### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from *A. thaliana* seedlings using TriZol reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and treated with Turbo DNase (Ambion) for 60 min to eliminate contaminant DNA. First-strand cDNA synthesis was performed on 0.5 µg of treated RNA with the oligo (dT) primer using the “GoScript Reverse Transcriptase System Kit” following the manufacturer’s protocol (Promega).

**PCR and qPCR amplifications**

Semi-quantitative RT-PCR reactions of 24-35 cycles were performed using a PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA). Oligonucleotides *5'nuc1/3'nuc1*, *5'nuc2/3'nuc2*, *5'hsp70/3'hsp70*, *5'lti78/3'lti78* and *5'lti65/3'lti65* were used to amplify respectively *NUC1*, *NUC2*, *HSP70*, *LT178* and *LT165* transcripts in RT-PCR reactions.

For quantitative PCR (qPCR) reaction, LightCycler® 480 and MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR assay (Eurogentec) was used. Primers *5'nuc1q/3'nuc1q* and *5'nuc2q/3'nuc2q* were used to detect *NUC1* and *NUC2* transcripts. Each PCR reaction was in a 10µl volume reaction following manufacturer's conditions. The *ACTIN* gene was used as an internal standard and results were analyzed using the comparative cycle threshold method relative to input.

**NUC2 promoter: GUS activity assays**

The *NUC2::GUS* construct and histochemical detection were described previously in (Durut et al. 2014). All microscopic GUS images were observed using a Zeiss Axioskop 2 microscope and recorded using a Leica DC 300 FX digital camera (Leica).

**Oligonucleotides used in this work:**

*5'nuc2:* GACGAGGAAACTGTCCCTATG  
*3'nuc2:* CTACTCTTCATCATTAAGACCG  
*5'nuc1:* CCAAGAAGCCCGCAGCTGCTG  
*3'nuc1:* CTACTCGTCACCGAAGGTAGTC  
*5'elf1α :* CTAAGGATGGTCAGACCCG  
*3'ef1α :* CTTCAGGTATGAAGACACC  
*5'act7q:* TCGTGGTGGTGAGTTTGTTAC  
*3'act7q:* CAGCATCATCACAAGCATCC  
*5'nuc1q:* AACTCCAAAGGAATTGCTTACC  
*3'nuc1q:* CTCATCGACTACAAGATAGAATCC  
*5'nuc2q:* TTACTAGGCCGCGATG

3'nuc2q: GTCTCACGATCTGTTGG  
 5'hsp70: GAACACCACAATTCCGACC  
 3'hsp70: AGGTGTGTCGTCATCCATTC  
 5'lti78: AGGAGAAGAAGAGAAGAAGG  
 3'lti78: ACAGTGGAGCCAAGTGATT  
 5'lti65: GGAAGGAAAAGGTGGAGA  
 3'lti65: CCCAGAATCTTGA ACTCCC

## Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). MAE was supported by a fellowship from the Egyptian government and ND by the fellowship of UPVD.

## Reference

- Abou-Ellail M, Cooke R, Saez-Vasquez J. 2011. Variations in a team: Major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**.
- Alvarez M, Molina A, Quezada C, Pinto R, Krauskopf M, Vera MI. 2004. Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *Journal of thermal biology* **29**: 663-667.
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S et al. 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *The EMBO journal* **25**: 1669-1679.
- Cavrak VV, Lettner N, Jamge S, Kosarewicz A, Bayer LM, Mittelsten Scheid O. 2014. How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. *PLoS Genet* **10**: e1004115.
- Daniely Y, Borowiec JA. 2000. Formation of a complex between nucleolin and replication protein A after cell stress prevents initiation of DNA replication. *The Journal of cell biology* **149**: 799-810.

- Daniely Y, Dimitrova DD, Borowiec JA. 2002. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Molecular and cellular biology* **22**: 6014-6022.
- De A, Donahue SL, Tabah A, Castro NE, Mraz N, Cruise JL, Campbell C. 2006. A novel interaction [corrected] of nucleolin with Rad51. *Biochemical and biophysical research communications* **344**: 206-213.
- Durut N, Abou-Ellail M, Pontvianne F, Das S, Kojima H, Ukai S, de Bures A, Comella P, Nidelet S, Rialle S et al. 2014. A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in Arabidopsis. *The Plant cell*.
- Goldstein M, Derheimer FA, Tait-Mulder J, Kastan MB. 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 16874-16879.
- Jiang B, Zhang B, Liang P, Song J, Deng H, Tu Z, Deng G, Xiao X. 2010a. Nucleolin/C23 mediates the antiapoptotic effect of heat shock protein 70 during oxidative stress. *The FEBS journal* **277**: 642-652.
- Jiang Y, Li Z, Nagy PD. 2010b. Nucleolin/Nsr1p binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology* **396**: 10-20.
- Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. 2004. Nucleolin interacts with telomerase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 51508-51515.
- Kim K, Dimitrova DD, Carta KM, Saxena A, Daras M, Borowiec JA. 2005. Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation. *Molecular and cellular biology* **25**: 2463-2474.
- Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. 2012. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PloS one* **7**: e49245.
- Kojima H, Suzuki T, Kato T, Enomoto K, Sato S, Tabata S, Saez-Vasquez J, Echeverria M, Nakagawa T, Ishiguro S et al. 2007. Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of Arabidopsis thaliana and its role in ribosome synthesis, growth and development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **49**: 1053-1063.

- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 310-316.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* **138**: 882-897.
- Liu Y, Taylor MW, Edenberg HJ. 2006b. Model-based identification of cis-acting elements from microarray data. *Genomics* **88**: 452-461.
- Masiuk M. 2010. Nucleolin-Characteristics of Protein and its Role in Biology of Cancer and Viral Infections. *Advances in Cell Biology* **1**: 1-19.
- Mongelard F, Bouvet P. 2007. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology* **17**: 80-86.
- Nordin K, Vahala T, Palva ET. 1993. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* **21**: 641-653.
- Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Mittelsten Scheid O. 2010. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 3118-3129.
- Petricka JJ, Nelson TM. 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant physiology* **144**: 173-186.
- Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ et al. 2010. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **6**: e1001225.
- Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Molecular biology of the cell* **18**: 369-379.
- Quezada C, Navarro C, San Martin R, Alvarez M, Molina A, Vera MI. 2006. Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: evidence for several genes. *Biological research* **39**: 353-365.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive

- and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18822-18827.
- Sobol MA, Gonzales-Camacho F, Kordyum EL, Medina FJ. 2007. Nucleolar proteins change in altered gravity. *J Appl Biomed* **5**: 49-56.
- Sripinyowanich S, Chamnanmanoontham N, Udomchalothorn T, Maneeprasopsuk S, Santawee P, Buaboocha T, Qu LJ, Gu H, Chadchawan S. 2013. Overexpression of a partial fragment of the salt-responsive gene OsNUC1 enhances salt adaptation in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.) during salt stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **213**: 67-78.
- Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, Mathieu O, Paszkowski J, Vaillant I. 2010. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS genetics* **6**: e1001175.
- Tong CG, Reichler S, Blumenthal S, Balk J, Hsieh HL, Roux SJ. 1997. Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. *Plant physiology* **114**: 643-652.
- Tremousaygue D, Garnier L, Bardet C, Dabos P, Herve C, Lescure B. 2003. Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J* **33**: 957-966.
- Wang K, Deng G, Chen G, Liu M, Yi Y, Yang T, McMillan DR, Xiao X. 2012. Heat shock protein 70 inhibits hydrogen peroxide-induced nucleolar fragmentation via suppressing cleavage and down-regulation of nucleolin. *Cell stress & chaperones* **17**: 121-130.
- Zhang B, Wang H, Jiang B, Liang P, Liu M, Deng G, Xiao X. 2010. Nucleolin/C23 is a negative regulator of hydrogen peroxide-induced apoptosis in HUVECs. *Cell stress & chaperones* **15**: 249-257.
- Zhang L, Hu Y, Yan S, Li H, He S, Huang M, Li L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Mol Biol* **79**: 285-293.
- Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of experimental botany* **61**: 1959-1968.

## B- Résultats complémentaires

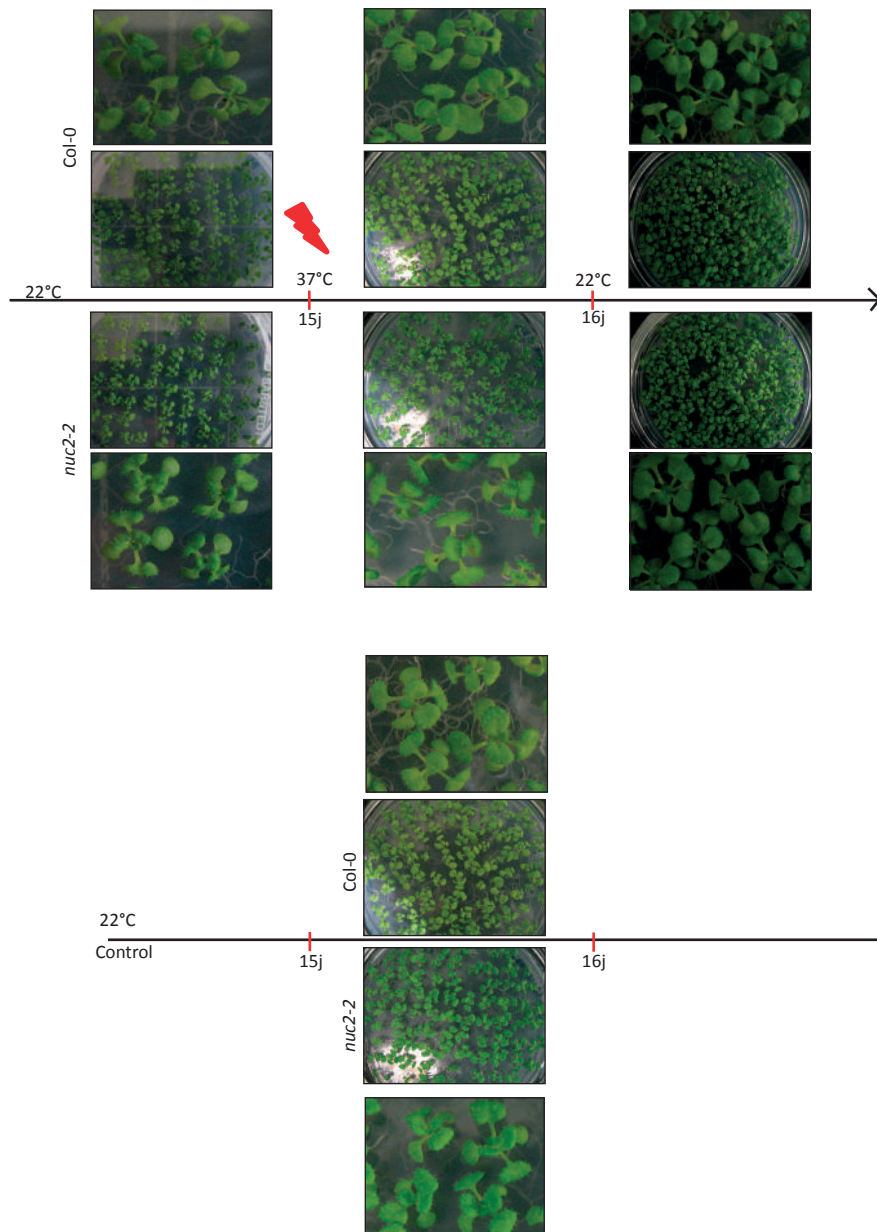
Précédemment, nous avons montré que le gène *NUC2* est induit en réponse au stress et plus particulièrement en réponse à la chaleur. Des *cis*-acting éléments ont été identifiés dans le promoteur du gène et semblent être responsables de l'activation du gène en réponse à des conditions particulières. Afin de compléter cette étude, nous nous sommes intéressés au phénotype des plantes mutantes *nuc2-2* en réponse au stress afin de voir s'il existe un lien entre la fonction du gène *NUC2* et le stress thermique.

### 1- Analyse phénotypique des mutants *nuc2* en réponse au stress thermique

Des graines de plantes sauvages WT Col-0 et mutantes *nuc2-2* ont été semées sur milieu MS et mises en chambre de culture pendant 15j à 22°C en lumière continue. Par la suite, les plantules ont été placées à 37°C pendant 24 h puis remises à 22°C pendant 3 jours. Aucun phénotype n'a été observé ni sur les plantes sauvages ni sur les plantes mutantes *nuc2-2* suite au stress (Figure 22).

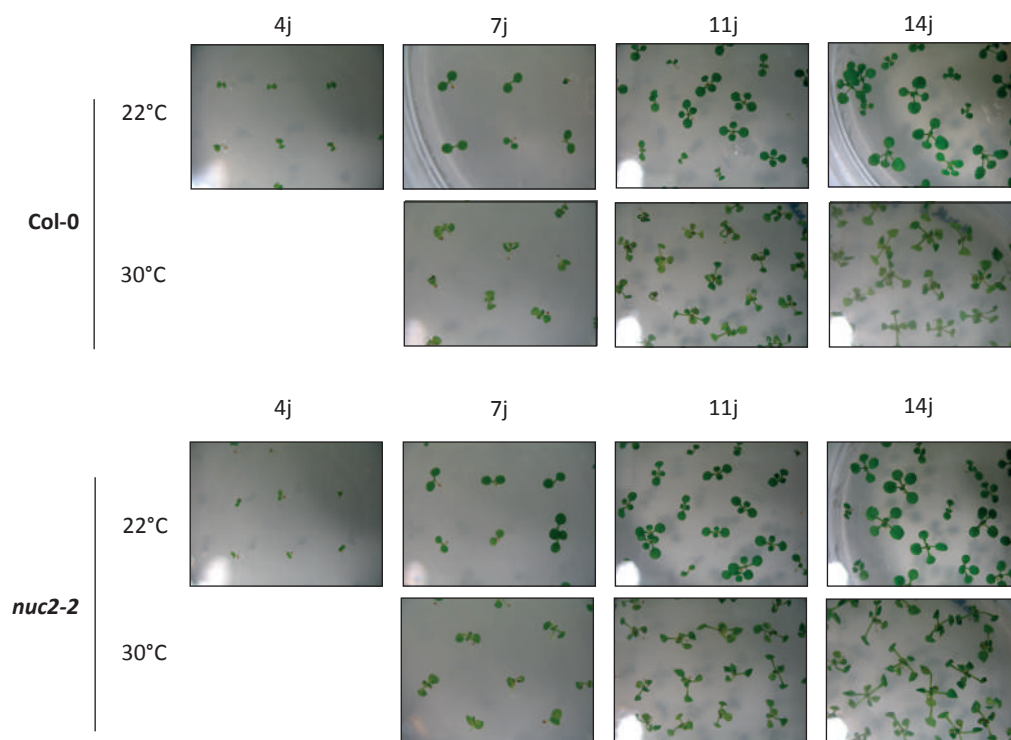
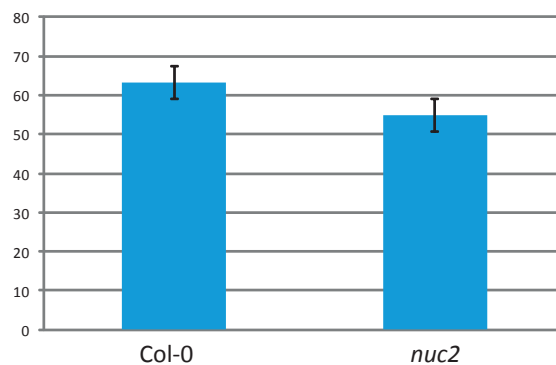
La protéine *NUC2* s'accumule à 10j (Durut et al. 2014) ce qui suggère son importance à ce stade de développement. Dans ce contexte, nous avons alors cherché à déterminer si l'absence de la *NUC2* affecte le développement en réponse au stress thermique. Pour cela, des plantes sauvages et mutantes ont été semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant cette fois-ci 4 jours. Une fois les cotylédons sortis, les plantules ont été transférées à 30°C pendant 10 jours (Figure 23A). Nous avons pu remarquer que la croissance aussi bien des plantes sauvages que des plantes mutantes est affectée à ce stade de développement suite au stress. Néanmoins, aucune différence phénotypique entre les plantes sauvages et les mutants *nuc2-2* n'a été observée. En conséquence, nous avons décidé de réaliser un test de survie. Pour cela, les plantes sauvages et mutantes *nuc2-2* ont été semées en duplicat sur milieu MS puis déposées en chambre de culture pendant 5j à 22°C. Par la suite, les plantules ont été placées à 35°C pendant 6 jours puis remises à 22°C. Le taux de survie des plantes a été déterminé 7 jours après le retour à 22°C (Figure 23B). Les résultats présentés révèlent un taux de survie d'environ 63% pour les plantes sauvages et de 54% pour les mutants *nuc2-2* ce qui suggère que l'absence de la protéine *NUC2* affecte la





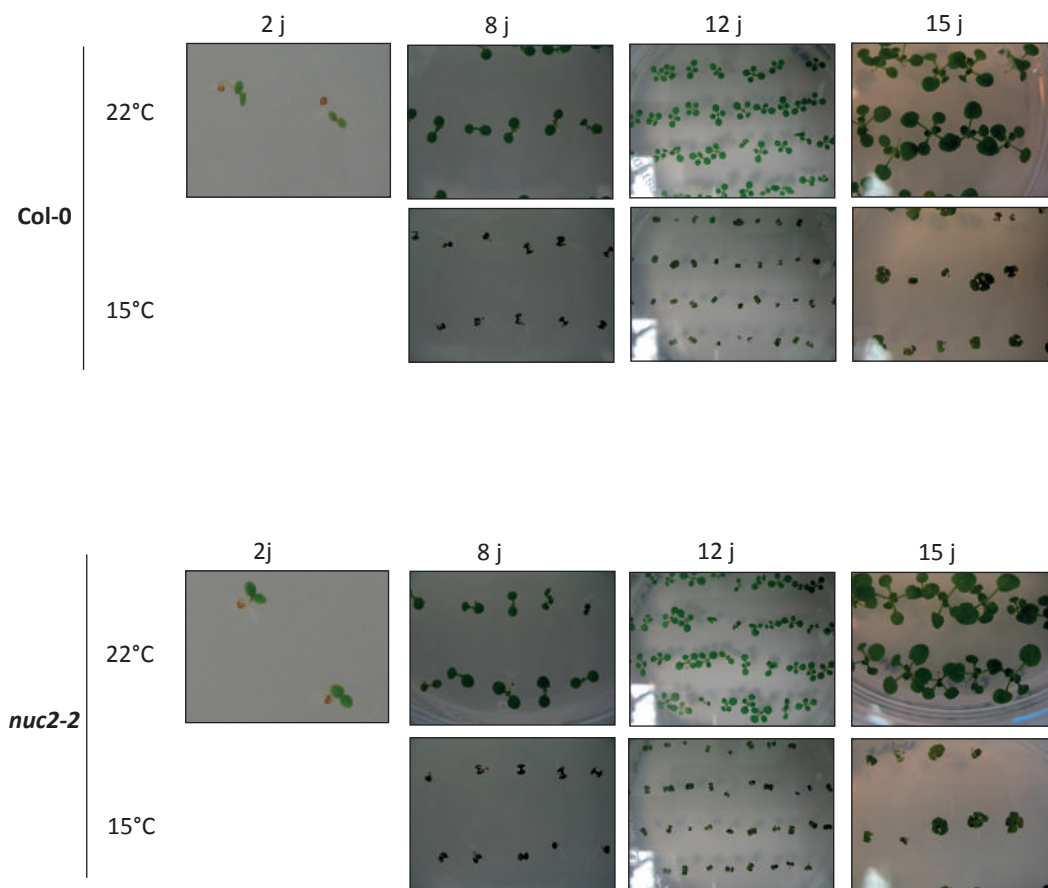
**Figure 22:** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 37°C

Photographies de plantules sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2*. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 14 jours. Par la suite, les plantules sont placées à 37°C pendant 24 h puis replacées à 22°C. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle. La croissance des plantes à 22°C et 37°C est réalisée en lumière continue.

**A****B***Test de survie*

**Figure 23 :** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 30°C et test de survie

**A :** Photographies de plantules sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 4, 7, 11 et 14j. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 3 jours. Par la suite, les plantules sont transférées à 30°C pendant 10 jours. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle. **B :** Test de survie des plantes sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 35°C. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées 5j à 22°C. Par la suite, les plantules sont transférées à 35°C pendant 6j. Après 7j de retour à 22°C, le nombre de plantules ayant survécu au stress est comptabilisé.



**Figure 24:** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 15°C

Photographies de plantules sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 2, 8, 12 et 15j. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 2 jours. Par la suite, les plantules sont transférées à 15°C pendant 12 jours. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle.

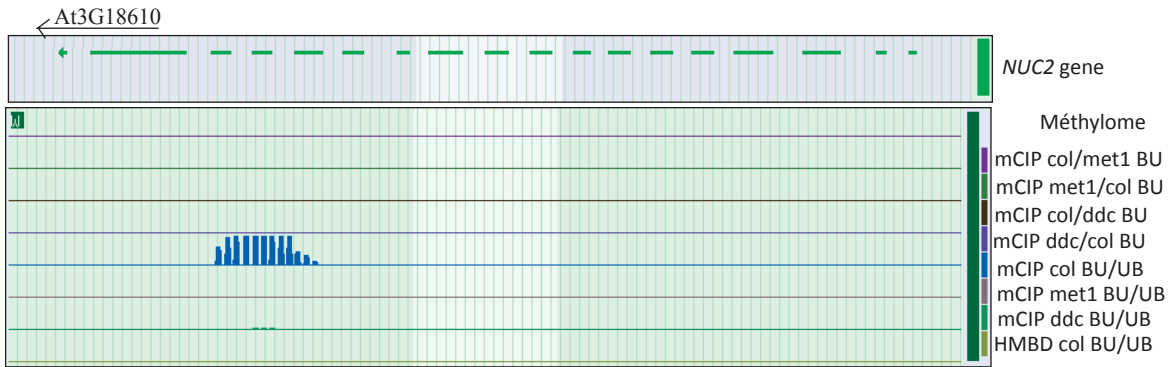
survie de la plante suite à un stress thermique (données obtenues en collaboration avec Rémy Merret).

Précédemment, nous avons également montré qu'une longue période de froid n'affectait pas l'expression du gène *NUC2* sauf si cette période est suivie d'un stress thermique. Dans ces conditions, nous avons analysé le phénotype des plantes exposées à de faibles températures. Pour cela, nous avons semé des graines de plantes sauvages WT Col-0 et mutantes *nuc2-2* sur milieu MS et placé les boîtes en chambre de culture à 22°C en lumière continue. A deux jours, les boîtes sont transférées à 15°C pendant 15 jours toujours en lumière continue (Figure 24). Aucune différence phénotypique n'est observée entre les plantes sauvages WT et mutantes *nuc2-2* en réponse au froid. Cependant, en présence de basse température, toutes les plantules présentent une croissance fortement ralentie : les plantules sont plus petites et les feuilles recourbées vers l'intérieur.

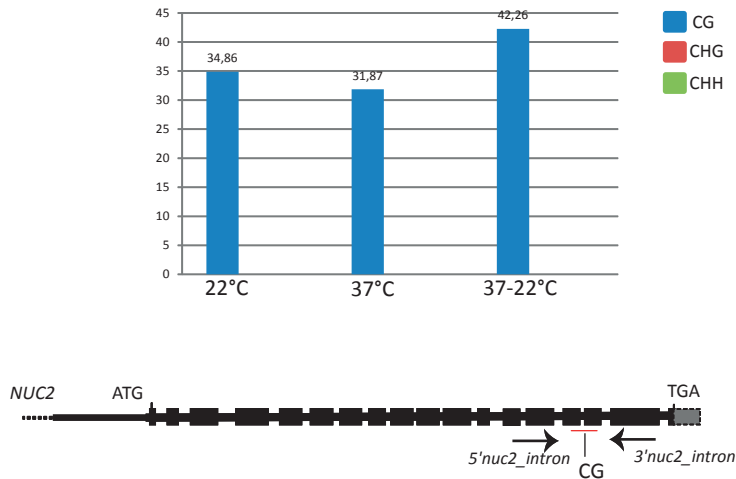
L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude ne nous a pas permis d'établir clairement un lien fonctionnel entre le gène *NUC2* et la réponse au stress thermique d'un point de vue phénotypique. Pourtant, il semblerait que l'absence de la protéine *NUC2* diminue le taux de survie des plantes à la chaleur ce qui suggère un lien potentiel entre la *NUC2* et la réponse au stress thermique. Cependant, il n'est pas à exclure que l'ensemble des conditions testées ne correspondent peut-être pas aux conditions dans lesquelles la protéine *NUC2* pourrait avoir un effet sur le développement ou bien la croissance de la plante.

## **2- Le niveau de méthylation du gène *NUC2* n'est pas affecté en réponse à la chaleur**

Le gène *NUC2* est fortement induit en réponse à la chaleur. Des données issues du méthylome (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/methylome>) ont révélé la présence d'un îlot de méthylation dans la région 3' de la séquence du gène *NUC2* (Figure 25A). Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si le stress thermique affecte le niveau de méthylation du gène *NUC2*. Pour cela, nous avons réalisé une analyse bisulfite à partir de plantes sauvages Col-0 de 15j traitées à 22°C et à 37°C pendant 24 h (Figure 25B). Cependant, aucune différence majeure du niveau de méthylation n'a été observée ce qui suggère qu'en réponse

**A****B**

### Séquençage Bisulfite



**Figure 25 :** Méthylation du gène *NUC2* en réponse à la chaleur

**A :** Graphique représentant le méthylome du gène *NUC2*. Les données ont été obtenues à partir du site « Salk Institute Genomic Analysis Laboratory » (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/methylome>). **B :** Séquençage bisulfite du gène *NUC2* des plantes sauvages à température ambiante, à 37°C puis de retour à 22°C. L'histogramme représente le pourcentage de sites méthylés en CG, CHG et CHH.

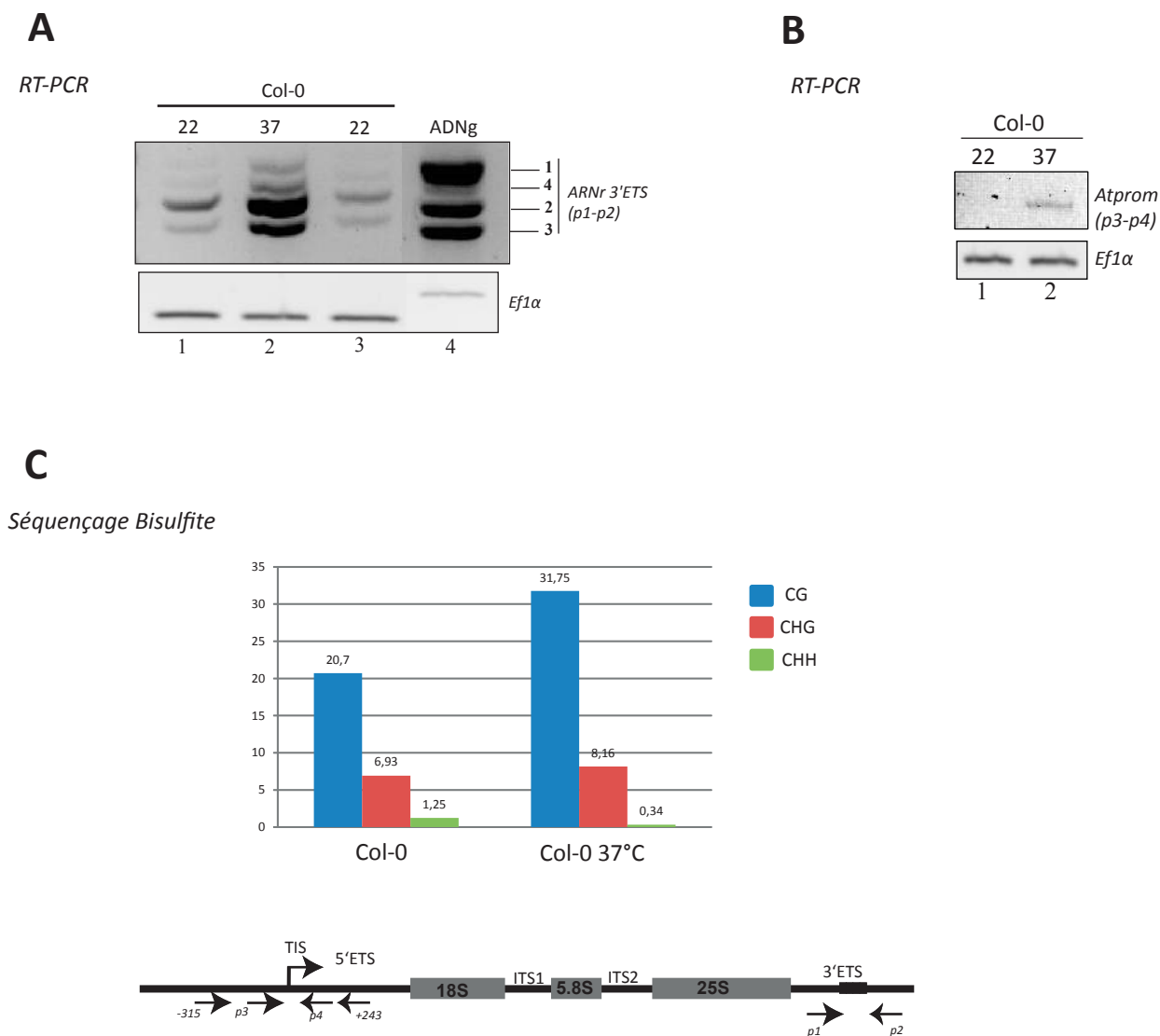
au stress thermique, le gène *NUC2* est probablement régulé par des facteurs de transcription et d'activation et non par des mécanismes épigénétiques. Néanmoins, il serait intéressant de regarder les marques associées aux histones.

### 3- Les gènes d'ARNr en réponse au stress thermique

Une des stratégies mise en place par la cellule pour répondre au stress est de diminuer la synthèse des ribosomes (Boulon et al. 2010). A ce jour, plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance du nucléole et de la nucléoline dans la réponse au stress chez les animaux (Cf. Introduction, Sections I-B3 et III-B-2c). Par exemple, en condition de stress thermique, la structure du nucléole est affectée (Jacob et al. 2013), la transcription des gènes d'ARNr diminuée (Sadis et al. 1988) et la nucléoline est relocalisée vers le cytoplasme (Daniely et al. 2002).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'effet de la température sur l'expression des gènes d'ARNr chez *A. thaliana* (Figure 26). Nous avons pu mettre en évidence une accumulation des transcrits ARNr en réponse à la chaleur (Figure 26A). En revanche, aucun changement d'expression des différents variants n'est observé ce qui suggère que le stress thermique n'induit pas une réactivation et/ou une répression des populations de gènes déjà inactives et/ou actives. Nous avons également détecté de longs transcrits générés 110pb en amont du TIS (Figure 26B). Ces transcrits pourraient servir de guide pour les enzymes de méthylation ou bien participer aux processus de séquestration des protéines comme cela a été démontré chez les animaux (Audas et al. 2012a). De manière intéressante, une augmentation du taux de méthylation est observée en réponse à la chaleur (Figure 26C), ainsi il est envisageable que les longs transcrits puissent être impliqués dans le processus de méthylation des gènes d'ARNr. Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier l'accumulation de petits ARN ainsi que des précurseurs ARNr au niveau de la région 3'ETS par Northern Blot.

Par ailleurs, des résultats préliminaires révèlent une modification de la structure du nucléole en réponse à la chaleur, ce qui laisse penser que l'expression des ADNr est altérée ou du moins modifiée (résultats non montrés).



**Figure 26 :** Expression des gènes d'ARNr en réponse à la chaleur

Des graines de plantes sauvages Col-0 ont été semées sur milieu MS et transférées en chambre de culture pendant 15 jours dans des conditions standards de culture (lumière continue, 22°C). A 15j, les plantules sont mises à 37°C pendant 24 h puis transférées à nouveau à 22°C pendant 3 jours. **A** : Analyse de l'expression des gènes d'ARNr par RT-PCR à 22°C et à 37°C. Les amorces *p1/p2* (*5'3ets/3'3ets*) encadrant la région 3'ETS polymorphique permettent l'amplification des différentes formes de variantes. L'amplification du gène *EF1α* est utilisée comme témoin de charge. **B** : Analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits ARNr générés en amont du TIS à 22°C et à 37°C à l'aide des amorces *p3/p4* (*5'AtHind110/3'At5'ETS+228*). **C** : Séquençage bisulfite de la région promotrice-5'ETS des ADNr à l'aide des amorces *5'-315/3'+243*. L'histogramme présente le pourcentage de sites méthylés CG, CHG et CHH à température ambiante et à 37°C.

Diagramme représentant une unité génique 45S avec les espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et la séquence codant les trois ARNr (18S, 5.8S et 25S) séparés entre eux par des espaceurs internes (ITS1 et ITS2). Les amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR et de séquençage bisulfite sont également indiquées.

## Partie III : Résultats complémentaires

---



## A- Purification des protéines recombinantes nucléoline et histones

La mutation des gènes *NUC1* et *NUC2* affecte le niveau de méthylation des gènes d'ARNr ainsi que leur expression (Pontvianne et al. 2010; Durut et al. 2014). La question que nous nous sommes alors posée est : *Comment les protéines nucléolines, qui présentent des activités antagonistes, pourraient affecter la méthylation et par conséquent, l'organisation chromatinienne des gènes ribosomiques ?*

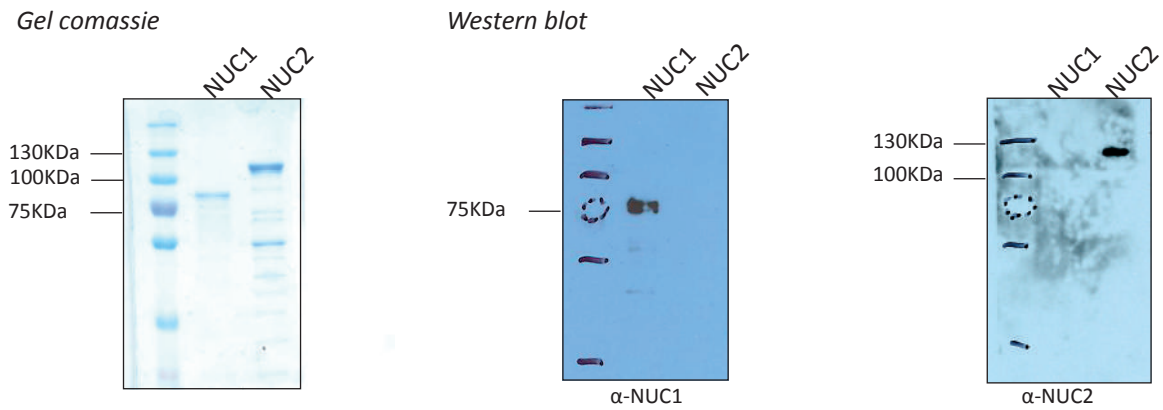
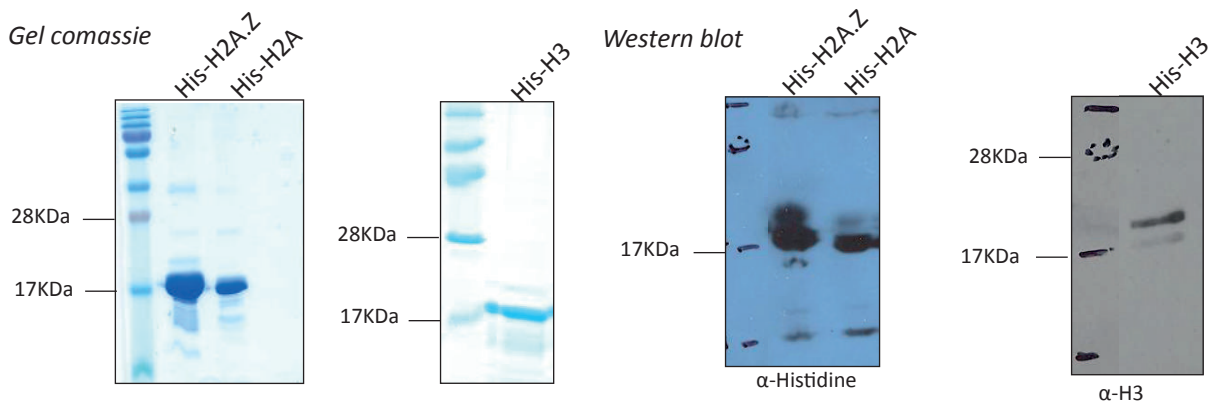
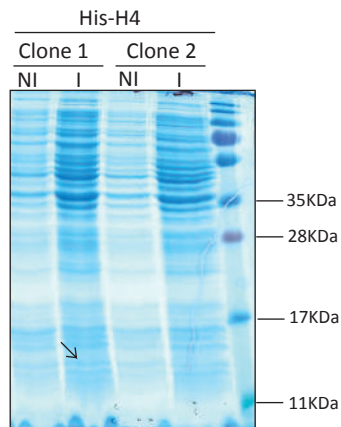
Il est admis que la méthylation de l'ADN est étroitement liée à la composition et la position du nucléosome (Zilberman et al. 2008; Kobor and Lorincz 2009). De ce fait, les variations de méthylation observées dans la région 5'ETS des gènes d'ARNr dans les mutants *nuc1* et *nuc2* pourraient s'expliquer par un changement de composition des nucléosomes sur le brin d'ADN d'autant plus qu'il a été démontré que les protéines NUC1 et NUC2 se lient aux nucléosomes et que NUC1 est capable d'assister le remodelage du nucléosome (Durut et al. 2014). Il est alors envisageable que les protéines NUC1 et NUC2 puissent être impliquées dans le remodelage de la structure chromatinienne des gènes ribosomiques en interagissant de façon spécifique avec des histones canoniques et/ou variants. Les protéines nucléoline pourraient, de par leur potentielle fonction d'histone chaperonne, participer à la dynamique nucléosomale soit en incorporant des histones au sein du nucléosome ou bien au contraire en les éliminant du nucléosome. Chez les animaux, la nucléoline stimule le remodelage de nucléosomes contenant le variant macroH2A mais pas ceux contenant le variant H2ABbd (Angelov et al. 2006). Ainsi, la nucléoline affecte distinctement la dynamique des nucléosomes en fonction de la présence de variants d'histones ou canoniques. Il reste alors à déterminer si les protéines NUC1 et NUC2 pourraient avoir des interactions spécifiques avec certaines histones telles que H2A.Z, H2A.W récemment identifiée (Yelagandula et al. 2014) ou encore avec des histones modifiées (H2B ubiquitinée...).

Afin de répondre à ces questions, nous nous proposons de vérifier si les protéines NUC1 et NUC2 interagissent avec les histones (canonique ou variants) *via* des études

d'interaction *in vitro*. Pour cela, nous avons initié différentes constructions permettant d'obtenir les protéines recombinantes NUC1, NUC2, H2A, H2A.Z, H3 et H4 (Figure 27).

En ce qui concerne les protéines nucléoline NUC1 et NUC2, les constructions ont été réalisées *via* le système Gateway<sup>R</sup> (Invitrogen). Après purification, nous avons vérifié la qualité des protéines par gel Coomassie et Western Blot (Figure 27A). Sur le gel Coomassie, nous avons observé une bande d'environ 75 KDa correspondant à la protéine NUC1. Pour la protéine NUC2, suite à la coloration, plusieurs bandes apparaissent, dont une à 110 KDa correspondant à la taille attendue de la protéine. Par la suite, l'analyse par Western Blot a permis de confirmer la présence des protéines NUC1 et NUC2. Aucun autre signal n'est observé indiquant que les anticorps anti-NUC1 et anti-NUC2 ne cross-réagissent pas avec les protéines NUC2 et NUC1 respectivement. Par ailleurs, les bandes observées suite à la coloration au bleu de Coomassie dans la piste NUC2 ne sont pas détectées par Western Blot. Ces dernières pourraient alors correspondre à des produits de dégradation qui ne sont pas reconnus par l'anticorps ou bien à des contaminants. Dans ce cas, ces derniers seront alors éliminés au cours d'une étape supplémentaire de purification.

Pour les protéines histones, nous avons cloné les séquences codant chacune des histones (H2A, H2A.Z, H3 et H4) dans le vecteur Pet16b taggué Histidine au niveau de l'extrémité N-terminale. Pour l'histone H2B, le clone a été produit par Frédy Barneche, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS, Paris). Les protéines ont été produites à partir des bactéries *Escherichia coli* BL21, purifiées sur colonne nickel en présence d'urée, car les histones sont des protéines insolubles, puis dialysées dans de l'eau afin d'éliminer l'urée. Les protéines recombinantes ont ensuite été vérifiées sur gel Coomassie et par Western Blot (Figure 27B et C). La taille théorique des différentes histones est d'environ 16.35 KDa pour l'histone His-H2A, 17 KDa pour His-H2A.Z, 17.8 KDa pour His-H3 et 14.36 KDa pour His-H4. Pour les protéines H2A, H2A.Z et H3, les fractions déposées sur gel coloré au bleu de Coomassie ne sont pas totalement pures et nécessitent de nouvelles étapes de purifications (Figure 27B). Les analyses par Western Blot ont permis de confirmer la présence de ces protéines : en effet, une bande intense à environ 17 KDa pour H2A.Z, une bande légèrement inférieure à 17 KDa pour H2A, et une bande supérieure à 17 KDa pour H3 ont été détectées. En revanche, nous avons rencontré quelques difficultés concernant la production de

**A****B****C**

**Figure 27 :** Production des protéines recombinantes nucléoline et histone

**A :** Production des protéines recombinantes NUC1 et NUC2. A gauche : Gel Coomassie suite à la purification des protéines His-NUC1 et His-NUC2. A droite : Analyse par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -NUC1 et  $\alpha$ -NUC2 des fractions purifiées des protéines NUC1 et NUC2. **B :** Production des protéines recombinantes histones. A gauche : Gel Coomassie suite à la purification des protéines His-H2A, His-H2A.Z et His-H3. A droite : Analyse par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -Histidine pour les protéines H2A et H2A.Z et  $\alpha$ -H3 pour la protéine H3. **C :** Gel Coomassie présentant les extraits bactériens avant et après induction avec 1 mM IPTG pour la protéine His-H4. Deux cultures issues de clones différents ont été analysées pour le construit H4. La flèche indique la taille attendue pour la protéine H4.

|     |            |            |            |             |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| H4  | ATG        | TCA        | GGT        | CGT         | GGA        | AAG        | GGA        | GGC        | AAA        | GGT        | TTG        | GGC        | AAA        | GGT        | GGA        | GCC        | AAA        | CGT        | CAT        | AGG        | 60  |
| H4* | ATG        | AGC        | GGT        | CGT         | GGT        | AAA        | GGT        | GGC        | AAA        | GGT        | CTG        | GGC        | AAA        | GGT        | GGC        | GCC        | AAA        | CGT        | CAT        | CGT        | 60  |
|     | <b>Met</b> | <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Arg</b>  | <b>Gly</b> | <b>Lys</b> | <b>Gly</b> | <b>Gly</b> | <b>Lys</b> | <b>Gly</b> | <b>Leu</b> | <b>Gly</b> | <b>Lys</b> | <b>Gly</b> | <b>Gly</b> | <b>Ala</b> | <b>Lys</b> | <b>Arg</b> | <b>His</b> | <b>Arg</b> |     |
| H4  | AAG        | GTT        | CTG        | AGA         | GAC        | AAC        | ATC        | CAA        | GGA        | ATC        | ACT        | AAA        | CCG        | GCG        | ATT        | CGG        | AGA        | TTG        | GCT        | CGT        | 120 |
| H4* | AAA        | GTT        | CTG        | CGT         | GAC        | AAC        | ATC        | CAG        | GGC        | ATC        | ACC        | AAA        | CCG        | GCG        | ATT        | CGT        | CGT        | CTG        | GCC        | CGT        | 120 |
|     | <b>Lys</b> | <b>Val</b> | <b>Leu</b> | <b>Arg</b>  | <b>Asp</b> | <b>Asn</b> | <b>Ile</b> | <b>Gln</b> | <b>Gly</b> | <b>Ile</b> | <b>Thr</b> | <b>Lys</b> | <b>Pro</b> | <b>Ala</b> | <b>Ile</b> | <b>Arg</b> | <b>Arg</b> | <b>Leu</b> | <b>Ala</b> | <b>Arg</b> |     |
| H4  | AGA        | GGT        | GGT        | GTT         | AAA        | CGT        | ATT        | AGT        | GGT        | CTG        | ATC        | TAG        | GAA        | GAG        | ACA        | CGT        | GGC        | GTT        | CTC        | AAG        | 180 |
| H4* | CGT        | GGT        | GGT        | GTT         | AAA        | CGT        | ATT        | AGC        | GGT        | CTG        | ATC        | TAT        | GAA        | GAA        | ACC        | CGT        | GGC        | GTT        | CTG        | AAA        | 180 |
|     | <b>Arg</b> | <b>Gly</b> | <b>Gly</b> | <b>Val</b>  | <b>Lys</b> | <b>Arg</b> | <b>Ile</b> | <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Leu</b> | <b>Ile</b> | <b>Tyr</b> | <b>Glu</b> | <b>Glu</b> | <b>Thr</b> | <b>Arg</b> | <b>Gly</b> | <b>Val</b> | <b>Leu</b> | <b>Lys</b> |     |
| H4  | ATC        | TTT        | TTG        | GAG         | AAT        | GTT        | ATC        | CGT        | GAC        | GCC        | GTT        | ACT        | TAC        | ACT        | GAG        | CAC        | GCT        | CGG        | AGG        | AAG        | 240 |
| H4* | ATC        | TTT        | CTG        | GAA         | AAC        | GTT        | ATC        | CGT        | GAC        | GCC        | GTT        | ACC        | TAT        | ACC        | GAA        | CAT        | GCC        | CGT        | CGT        | AAA        | 240 |
|     | <b>Ile</b> | <b>Phe</b> | <b>Leu</b> | <b>Glu</b>  | <b>Asn</b> | <b>Val</b> | <b>Ile</b> | <b>Arg</b> | <b>Asp</b> | <b>Ala</b> | <b>Val</b> | <b>Thr</b> | <b>Tyr</b> | <b>Thr</b> | <b>Glu</b> | <b>His</b> | <b>Ala</b> | <b>Arg</b> | <b>Arg</b> | <b>Lys</b> |     |
| H4  | ACG        | GTG        | ACT        | GCT         | ATG        | GAT        | GTT        | GTT        | TAT        | GCT        | CTT        | AAG        | AGA        | CAA        | GGA        | AGA        | ACT        | CTC        | TAC        | GGA        | 300 |
| H4* | ACC        | GTG        | ACC        | GCC         | ATG        | GAT        | GTT        | GTT        | TAT        | GCT        | CTT        | AAA        | CGT        | CAG        | GGT        | CGT        | ACC        | CTG        | TAT        | GGT        | 300 |
|     | <b>Thr</b> | <b>Val</b> | <b>Tha</b> | <b>Ala</b>  | <b>Met</b> | <b>Asp</b> | <b>Val</b> | <b>Val</b> | <b>Tyr</b> | <b>Ala</b> | <b>Leu</b> | <b>Lys</b> | <b>Arg</b> | <b>Gln</b> | <b>Gly</b> | <b>Arg</b> | <b>Thr</b> | <b>Leu</b> | <b>Tyr</b> | <b>Gly</b> |     |
| H4  | TTC        | GGC        | GGC        | TAG         | 312        |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |
| H4* | TTT        | GGC        | GGC        | TAA         | 312        |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |
|     | <b>Phe</b> | <b>Gly</b> | <b>Gly</b> | <b>Stop</b> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |

**Figure 28 :** Séquences nucléotidique et protéique de l'histone H4 chez *A. thaliana*

Sur la ligne du haut est représentée la séquence nucléotidique de l'histone H4. En jaune sont surlignés les codons rares pour la bactérie *E. coli*. Sur la ligne du milieu est représentée la séquence modifiée de l'histone H4 à synthétiser. Sur la ligne du bas, la séquence protéique est également indiquée.

l'histone recombinante H4. En effet, la protéine n'est pas induite (Figure 27C). Nous pensons que cela s'explique par la présence de codons rares dans la séquence qui ne sont pas reconnus par la bactérie (Chen and Texada 2006). Afin de remédier à ce problème, deux possibilités sont envisageables : d'une part, utiliser une souche *E. coli* contenant des codons rares (exemple : Ps codon) ou bien de reconstruire la séquence génique par PCR, à l'aide d'oligonucléotides chevauchants modifiés, comme cela a été décrit par (Luger et al. 1997) (Figure 28).

L'ensemble de ces outils nous permettra d'étudier les interactions potentielles entre les protéines nucléoline et les histones. Pour cela, nous réaliserons différentes combinaisons entre les histones et les protéines NUC1 et NUC2 suivies d'immuno-précipitations à l'aide des anticorps  $\alpha$ -NUC1 et  $\alpha$ -NUC2 afin de déterminer si les protéines nucléoline interagissent avec des monomères, des dimères voire des tétramères d'histones. D'autre part, nous pourrions également tester *in vitro* les activités chaperonne d'histones des protéines nucléoline dans l'assemblage et le désassemblage des nucléosomes. A plus long terme, ces outils nous permettront d'identifier les complexes de remodelage chromatinien chez *A. thaliana*, restés jusqu'à présent non caractérisés.

## B- Analyse de la longueur des télomères dans les mutants

### *nucléoline*

Les travaux menés sur les protéines NUC1 et NUC2 ont permis de mettre en évidence une expression différentielle des gènes d'ARNr et plus particulièrement la dérépression du *VAR1* (Pontvianne et al. 2010; Durut et al. 2014). De manière intéressante, ce phénotype a également été observé au sein d'autres mutants d'insertion dont *hda6*, *fas1* et *fas2* (Earley et al. 2010; Pontvianne et al. 2013). Les protéines FASCIATA 1 et 2 composent la sous-unité de l'histone chaperonne CAF-1, impliquée dans l'assemblage des tétramères H3-H4. De manière intéressante, il a été montré que CAF-1 est impliquée dans les processus liés à la recombinaison homologe (Endo et al. 2006; Kirik et al. 2006). De plus, l'absence des protéines FASCIATA 1 ou 2 induit un raccourcissement des télomères ainsi qu'une perte des gènes d'ARNr 45S (Mozgova et al. 2010), localisés à proximité des télomères sur les bras courts des chromosomes 2 et 4 (Pikaard 2002).

Chez les animaux, la nucléoline est une histone chaperonne (Angelov et al. 2006), capable d'interagir avec la télomérase hTERT (Khurts et al., 2004) et de se lier à l'ADN double brin télomérique (Pollice et al. 2000). Chez *A. thaliana*, des données issues de BAR ([http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis\\_interactions\\_viewer.cgi](http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi)) suggèrent une potentielle interaction entre la protéine NUC2 et l'enzyme TERT (Télomérase Reverse Transcriptase) bien que jusqu'à présent aucune interaction physique entre les protéines nucléoline et le complexe télomérase ou encore l'ADN télomérique n'ait été démontrée. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'impact de la mutation des gènes *NUC1* et *NUC2* dans la stabilité du génome *via* l'étude de la longueur des télomères. Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que l'absence de la protéine NUC1 induit un raccourcissement des télomères.

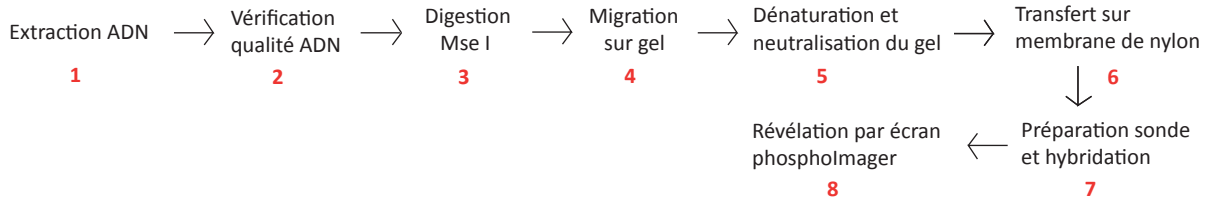
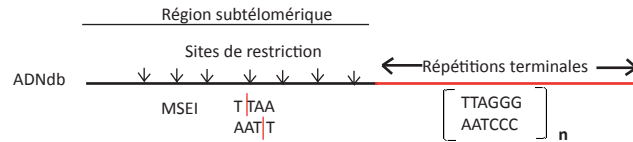
En collaboration avec l'équipe de Jiri Fajkus (Département de Biologie expérimentale, Université des Sciences Masaryk, Brno, République Tchèque), nous avons analysé la longueur des télomères dans les mutants *nuc1* et *nuc2*. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes permettant d'évaluer la taille des télomères : la méthode TRF (Terminal Restriction Fragment) et la méthode PETRA (Primer Extension Telomere Repeat Amplification).

La méthode TRF ou méthode dite aussi d'« hybridation sur réplique » permet de déterminer la longueur globale des télomères (Figure 29A). Cette technique consiste à digérer l'ADN avec l'enzyme MseI, une endonucléase qui clive l'ADN dans la région sub télomérique. Les fragments d'ADN sont par la suite séparés sur gel d'électrophorèse en fonction de leur taille puis analysés par Southern Blot. Un raccourcissement des télomères, se traduit par une différence de migration entre les échantillons testés et le contrôle, ici les plantes sauvages Col-0.

Les résultats présentés sur la figure 29B montrent une diminution de la longueur des télomères dans les mutants *nuc1-1* et *nuc1-2* (environ 1650-2000 pb) par rapport aux plantes sauvages (environ 3000 pb). En revanche, dans le mutant *nuc2-2* ainsi que dans les plantes *nuc2-2::gNUC2*, les fragments d'ADN digérés migrent quasiment à la même distance que ceux des plantes sauvages, autrement dit aucune différence de taille des fragments de télomères n'est observée. Dans les mutants *fas1-4* et *fas2-4*, nous observons une diminution

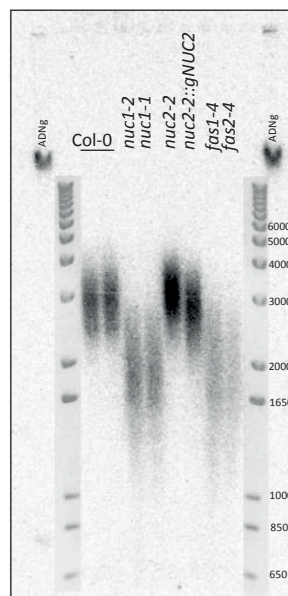
## A

### TRF Méthode



## B

### Southern Blot



**Figure 29:** Analyse de la longueur des télomères par la méthode TRF

**A :** Les différentes étapes de l'analyse par TRF. Le schéma présente l'extrémité d'un télomère avec sa région sub-télomérique contenant de multiples sites de restriction et la région 3' terminale composée du motif « TTAGGG » répété sur plusieurs milliers de paires de bases et dépourvue de sites de restriction. **B :** Analyse par Southern blot de la longueur des télomères à partir d'ADNg digéré avec l'enzyme MseI sur des plantules de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *nuc1-1*, *nuc1-2*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *fas1-4* et *fas2-4*. La sonde ADN *TR4C* cible la région contenant les motifs répétés. La taille des fragments est déterminée à l'aide du marqueur moléculaire 1Kb+.

de la taille des télomères comme cela a été décrit précédemment (Mozgova et al. 2010). Ainsi, il semblerait que la mutation du gène *NUC1* entraîne un raccourcissement des télomères alors qu'au contraire, l'absence de son homologue *NUC2* ne semble pas avoir d'impact sur la taille des télomères.

En parallèle, nous avons appliqué la deuxième méthode : PETRA qui permet cette fois-ci de déterminer la taille des télomères chromosome par chromosome (Figure 30A). Nous avons alors réalisé cette analyse sur chacun des 5 chromosomes d'*A. thaliana* tout en sachant que les gènes d'ARNr sont localisés sur les bras courts (Left, L) des chromosomes 2 et 4 (2L et 4L) (Figure 30B).

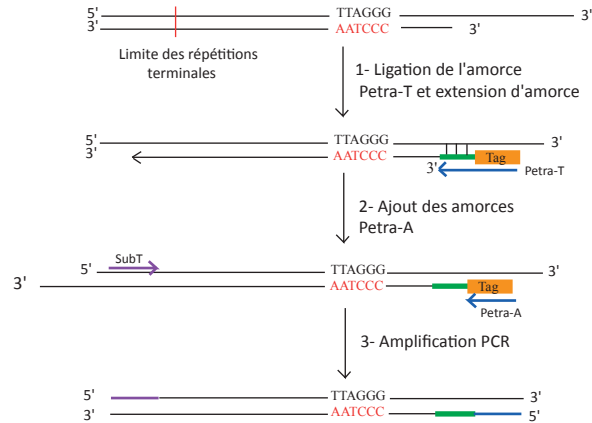
L'analyse du chromosome 2 a révélé que les fragments télomériques, amplifiés à partir des bras longs (Right, R) et courts (Left, L) sont plus petits dans les mutants *nuc1* que dans les plantes sauvages (Figure 31A). En effet, un signal est détecté à environ 5 Kb pour le chromosome 2L et 3 Kb pour le 2R dans les mutants *nuc1* alors que dans les plantes sauvages Col-0, les fragments sont plus grands (6 Kb pour le 2L et 4 Kb pour le 2R). Les signaux obtenus dans les mutants *fas* indiquent également une diminution de la taille des télomères comme cela a été montré par (Mozgova et al. 2010). En ce qui concerne les plantes *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2*, aucune différence majeure n'est observée pour le chromosome 2R par rapport aux plantes sauvages. En revanche, aucune amplification n'est détectée pour le bras court du chromosome 2 (2L). Ce résultat est assez surprenant étant donné qu'il s'agit du bras dans lequel sont localisés les gènes d'ARNr.

Pour le chromosome 4, les résultats obtenus sont similaires à ceux observés pour le chromosome 2. Les mutants *nuc1* possèdent des séquences télomériques plus courtes que les plantes sauvages (2.5 Kb pour *nuc1* et 3.5 Kb pour le WT). De même, aucune différence n'est observée dans les mutants *nuc2-2* et le mutant complémenté *nuc2-2::gNUC2* pour le chromosome 4R. En revanche, curieusement, là encore, aucun signal n'est détecté pour le bras court du chromosome 4 (4L). Une erreur technique semble peu concluante pour expliquer cette absence de signal qui semble être spécifique uniquement aux bras courts des chromosomes 2 et 4. Cependant, nous avons tout de même réalisé plusieurs répliques biologiques et ce avec différentes générations de mutants *nuc2* et de plantes complémentées *nuc2-2::gNUC2* (Figure 31B). Cependant, aucun signal n'est observé ce qui

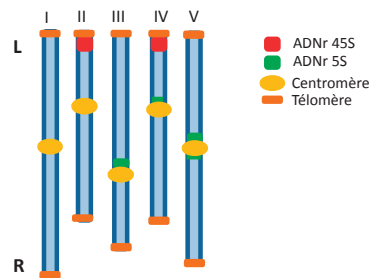


# A

## PETRA méthode

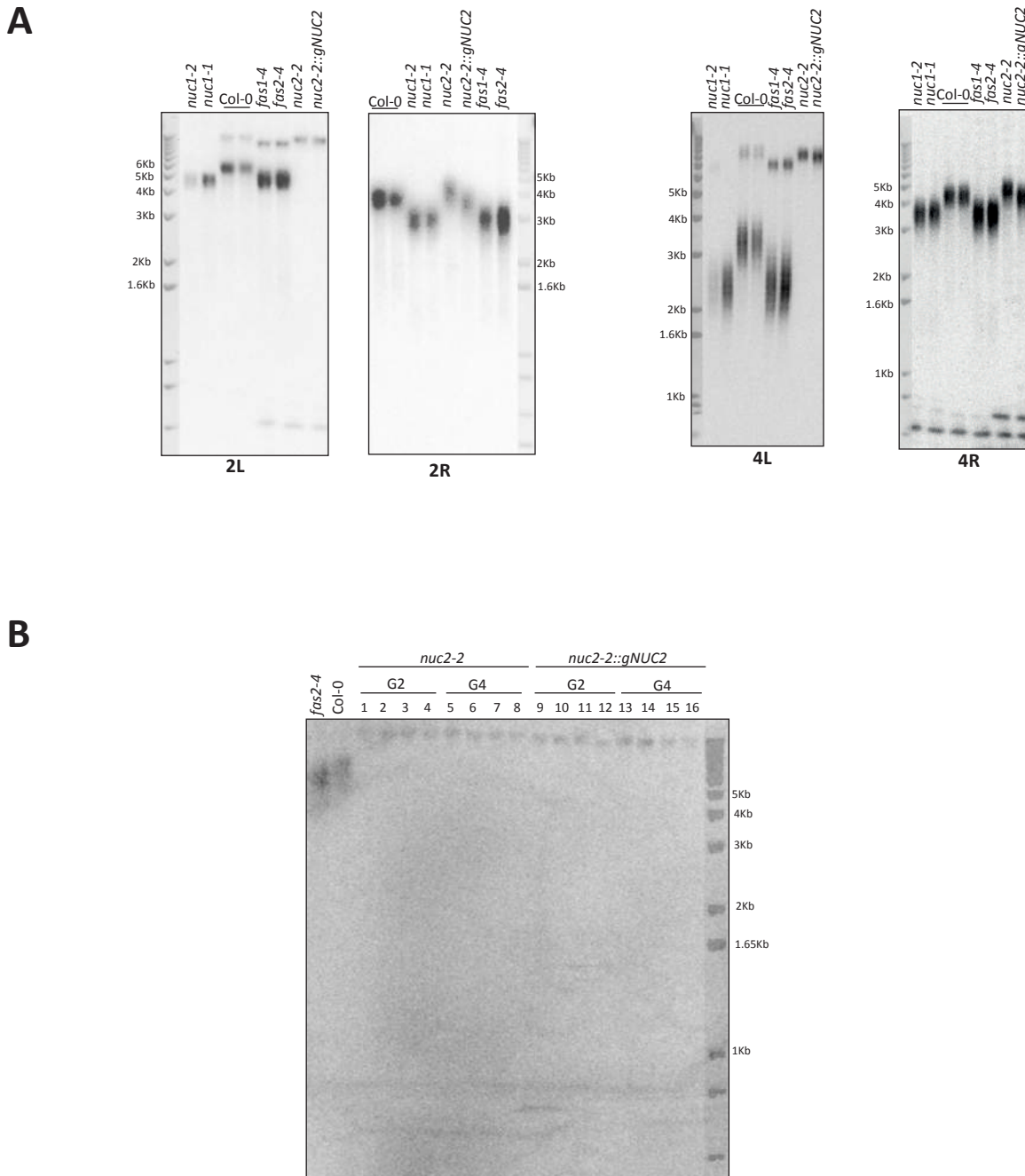


# B



**Figure 30 :** Diagramme représentant le principe de l'analyse par PETRA

**A :** Un adaptateur Petra-T, composé d'une séquence complémentaire au brin télomérique 3' et d'une étiquette dans la région 5', est hybridé sur la région 3' de l'ADN télomérique puis prolongé par réaction d'extension d'amorce. Ensuite, l'amorce Petra-A (complémentaire à l'étiquette du primer Petra-T) et les amorces spécifiques à chaque région sub télomérique des chromosomes (amorce SubT) sont ajoutées et une amplification PCR est réalisée. Par la suite, les fragments PCR sont séparés sur gel d'électrophorèse puis transférés sur une membrane de nylon. La membrane est hybridée à l'aide d'une sonde localisée dans la région répétée télomérique. **B :** Représentation schématiques des cinq chromosomes d'*A. thaliana*. Les centromères et télomères de chaque chromosome sont représentés ainsi que la localisation des gènes d'ARNr 45S et 5S. Les bras courts des chromosomes II et IV sont indiqués par la lettre L et les bras longs par la lettre R.



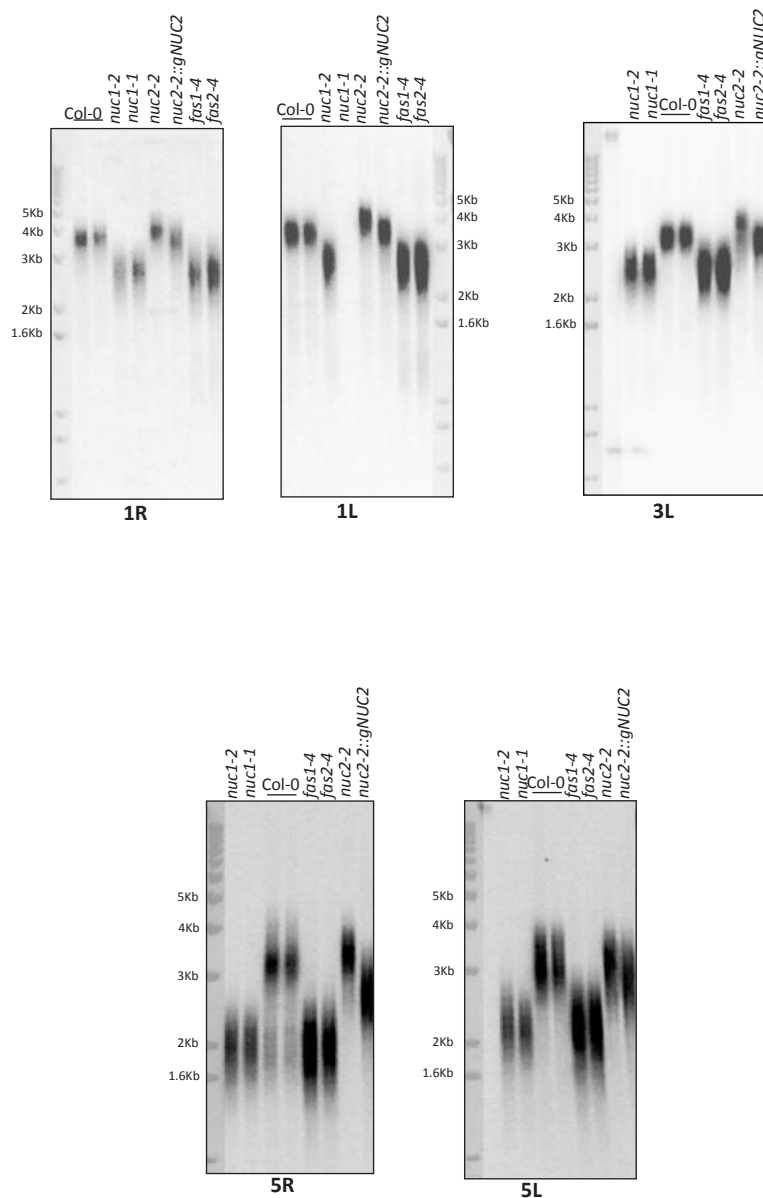
**Figure 31 :** Analyse de la longueur des télomères des chromosomes II et IV par la méthode PETRA

Analyse par Southern blot de la longueur des télomères des bras longs (2R et 4R) et courts (2L et 4L) des chromosomes II et IV : **A** : à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *nuc1-1*, *nuc1-2*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *fas1-4* et *fas1-2* et **B** : à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *fas1-2* et sur deux générations différentes de mutants *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2*. La sonde ADN *TR4C* cible la région contenant les motifs répétés. La taille des fragments est déterminée à l'aide du marqueur moléculaire 1Kb+.

suggère que dans le mutant *nuc2*, l'amplification des séquences télomériques des bras courts des chromosomes 2 et 4 est altérée. Cela pourrait s'expliquer par des modifications de séquences ne permettant pas l'hybridation de l'amorce sub-télomérique, spécifique à chaque bras de chromosome. Ce polymorphisme pourrait en partie être lié aux réarrangements génomiques des gènes d'ARNr 45S évoqués dans l'article (Durut et al. 2014).

Par la suite, la taille des télomères sur les autres chromosomes (1, 3 et 5) a été analysé (Figure 32). Nous avons pu observer que les résultats obtenus sont très similaires à ceux observés pour les chromosomes 2 et 4. Par exemple, pour le chromosome 1 (R et L), une diminution de la longueur des télomères est observée pour les mutants *nuc1-2* et *nuc1-1* (~3 Kb) par rapport aux plantes sauvages Col-0 (~4 Kb). Les profils obtenus dans le mutant *nuc2* sont également assez semblables à ceux observés dans les plantes sauvages. Les signaux sont légèrement plus haut que ceux détectés dans les plantes sauvages, contrairement aux plantes *nuc2-2::gNUC2*. Cependant nous ne considérons pas cette variation significative. Ainsi, ces résultats suggèrent que la stabilité des télomères n'est pas affectée dans les mutants *nuc2* et que l'absence de signaux observés pour les bras courts des chromosomes 2 et 4 est bien caractéristique aux régions télomériques localisées à proximité des gènes d'ARNr 45S.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un raccourcissement des télomères dans les mutants *nuc1*. Il semblerait que cette diminution ne soit pas associée aux gènes d'ARNr étant donné que ce phénotype est observé sur tous les chromosomes d'*A. thaliana*. Ainsi, la protéine NUC1 pourrait être impliquée dans la dynamique des télomères. Par exemple, NUC1 pourrait interagir avec l'ADN télomérique pour le maintenir à la périphérie du nucléole et ainsi le protéger d'éventuels événements de recombinaison. L'absence de la protéine NUC1 peut être considérée comme un véritable stress induisant une perte de la stabilité des télomères et par conséquent, du génome. Cependant, il ne faut pas oublier que la mutation du gène *NUC1* induit une déstructuration du nucléole qui pourrait à son tour influencer la dynamique des télomères. Dans ce contexte, la protéine NUC1 aurait un rôle plus indirect dans la stabilité des télomères.



**Figure 32 :** Analyse de la longueur des télomères des chromosomes I, III et V par la méthode PETRA

Analyse par Southern blot de la longueur des télomères de chaque bras des chromosomes I, III et V à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *nuc1-1*, *nuc1-2*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *fas1-4* et *fas1-2*. La sonde ADN *TR4C* cible la région contenant les motifs répétés. La taille des fragments est déterminée à l'aide du marqueur moléculaire 1Kb+.

# Discussion générale

---

## Deux gènes de la nucléoline chez *Arabidopsis thaliana*

Chez les vertébrés, la nucléoline est codée par un seul gène excepté chez le Xénope (Messmer and Dreyer 1993) et la Carpe (Quezada et al. 2006) où deux et trois gènes ont respectivement été identifiés. Cette organisation génomique spécifique de ces deux espèces peut-être expliquée par des événements de polyploïdisation (Taylor et al. 2001; David et al. 2003). De manière intéressante, chez les plantes, il existe au moins deux gènes codant les protéines nucléoline (Bogre et al. 1996; Pontvianne et al. 2007; Saez-Vasquez and Medina 2008). Au contraire des animaux, la présence de plusieurs copies n'est pas surprenante étant donné que les espèces végétales sont généralement des organismes polyploïdes (Charon et al. 2012). Chez *A. thaliana*, plusieurs événements de polyploïdisation sont à l'origine de l'organisation génomique actuelle et sans doute de la présence de deux gènes codant les protéines nucléoline : *NUC1* et *NUC2*, sur les régions dupliquées des chromosomes 1 (*NUC1*) et 3 (*NUC2*).

Le gène *NUC1* est exprimé de façon constitutive dans les différents tissus de la plante ainsi qu'au cours des différents stades de développement (Pontvianne et al. 2007). Le gène *NUC2*, quant à lui, est exprimé plus faiblement que *NUC1* et son expression est contrôlée au cours des premières étapes du développement de la graine ainsi qu'en réponse au stress (Cf. Résultats, Partie II et (Durut et al. 2014)). De manière intéressante, une accumulation de transcrits et de la protéine *NUC2* est observée dans les plantes mutantes *nuc1* ce qui suggère que le gène *NUC2* est capable de compléter, du moins partiellement, l'absence de *NUC1* (Pontvianne et al. 2007). Ainsi, au premier abord, il semblerait que ces deux gènes présentent des activités redondantes. L'analyse des mutants *nuc1* et *nuc2* a également permis de mettre en évidence l'importance de ces deux protéines dans le développement de la plante ; en effet, la protéine *NUC1* est importante pour la croissance et *NUC2* semble jouer un rôle dans la floraison (Pontvianne et al. 2007; Durut et al. 2014). Il apparaît que l'activité des promoteurs *NUC1* et *NUC2* est opposée dans les organes floraux ce qui souligne des profils d'expression différents entre ces deux gènes à certaines étapes du développement (Durut et al. 2014). Néanmoins, la mutation simultanée des gènes *NUC1* et *NUC2* est létale ce qui suggère d'une part, que ces deux gènes sont importants pour la survie de la plante et d'autre part, que le gène *NUC2* n'est pas un pseudo

gène, mais qu'il possède des activités particulières qui lui ont été attribuées au cours de l'évolution.

D'un point de vue fonctionnel, le gène *NUC1* a été caractérisé au laboratoire et défini comme étant l'homologue fonctionnel de la nucléoline chez les mammifères (Pontvianne et al. 2007; Pontvianne et al. 2010). La question s'est alors posée concernant le rôle de *NUC2* chez *A. thaliana*.

## La *NUC2* et les gènes d'ARNr

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence l'implication de la protéine *NUC2* dans l'organisation de la chromatine des gènes d'ARNr 45S. Dans le mutant *nuc2*, une accumulation des transcrits *VAR1* est observée, tout comme dans le mutant *nuc1*. Cependant, l'augmentation de la méthylation dans la région 5'ETS des ADNr rend difficilement explicable cette accumulation des transcrits *VAR1*, contrairement au mutant *nuc1* où les ADNr sont hypométhylés et l'ADN décondensé (Pontvianne et al. 2010). Par ailleurs, il est difficile de dire si la transcription des gènes *VAR1* est directement associée à l'absence du gène *NUC2* puisque dans les plantes mutantes *nuc2*, dans lesquelles la construction *pNUC2::gNUC2* a été introduite, la répression du *VAR1* n'est pas restaurée. Néanmoins, le niveau de méthylation ainsi que la floraison sont tous deux restaurés ce qui indique que la complémentation du gène *NUC2* est bien fonctionnelle. De plus, l'étude des lignées retro-croisées Col-0/*nuc2* et *nuc2*/Col-0 a révélé que certains mutants *nuc2*, ayant un nombre de copies *VAR1* similaire aux plantes sauvages, n'expriment pas le *VAR1* (Figure 20, lignées 91 et 196) ce qui suggère également que la protéine *NUC2* n'intervient pas directement dans l'expression des ADNr mais plutôt dans leur organisation (voir plus bas). Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si la protéine *NUC2* est capable de s'associer aux gènes d'ARNr afin de contrôler leur expression, *via* des analyses par immuno précipitation de la chromatine (ChIP). Cependant, pour le moment nous n'avons pas encore réussi à mettre au point les conditions optimales permettant de réaliser cette analyse pour *NUC2*.

De manière intéressante, au cours de cette étude, nous avons montré que le mutant *nuc2* présente une variation du nombre de copie des différents variants d'ARNr 45S.

En effet, le nombre de copies *VAR1* augmente alors qu'au contraire, le nombre de copie *VAR2* diminue, sans que le nombre total des gènes ne soit affecté (Durut et al. 2014). Cette réorganisation génomique est conservée suite à l'insertion de la construction *pNUC2 ::gNUC2* dans les mutants *nuc2*. De manière intéressante, les données obtenues suite à la purification des nucléoles par FANoS ont révélé qu'une fraction des gènes *VAR1* est associée aux nucléoles des plantes mutantes *nuc2* ce qui suggère que ces gènes sont transcrits par l'ARN Pol I. Ainsi la présence d'un plus grand nombre de copies *VAR1*, issue probablement de réarrangements génomiques, et leur localisation au sein du nucléole pourraient expliquer l'accumulation de transcrits *VAR1* observée dans les mutants *nuc2*.

En raison de leur forte répétition, les gènes d'ARNr sont sensibles aux mécanismes de recombinaison homologue (Urawa et al. 2001). Le changement du nombre de copies de variants observé dans le mutant *nuc2* pourrait alors être associé à des événements de recombinaison homologue, d'autant plus que dans les plantes complémentées, le nombre de copie de variants reste identique à celui observé dans les mutants *nuc2*, ce qui suggère que l'introduction du gène *NUC2* ne permet pas de rétablir l'organisation génomique initiale. Il est alors envisageable que l'absence de la protéine *NUC2* soit à l'origine d'une instabilité génomique se traduisant par exemple, par un défaut dans la formation de l'hétérochromatine comme cela a été proposé dans l'article (Durut et al. 2014). Si la protéine *NUC2* joue un rôle dans le « verrouillage » de la chromatine, nous devrions alors observer des changements du nombre de copies des variants dans les mutants *nuc2* issus des lignées rétro-croisées. En effet, l'analyse de ces plantes a permis d'identifier deux lignées *nuc2* dans lesquelles la proportion des variants est affectée entre la génération F2 et la génération F3 (Figure 20A). Par ailleurs, aucune variation n'a été observée dans les 5 générations de lignées contenant la construction *pNUC2 ::gNUC2* ce qui suggère que l'introduction du gène *NUC2* a permis de rétablir une certaine stabilité génomique au niveau des gènes d'ARN 45S (Figure 19A). De manière intéressante, les travaux menés par P. Fransz ont montré que le NOR2 est transcriptionnellement inactif (Fransz et al. 2002). D'autre part, il semblerait que les copies *VAR1* soient majoritairement localisées sur le NOR2 et que les gènes *VAR2* et *VAR3* soient regroupés sur le NOR4 (résultats non publiés en collaboration avec F. Barneche, Institut de Biologie à l'ENS, Paris). Ainsi les gènes actifs sont physiquement séparés des gènes inactifs. En conséquence, dans le mutant *nuc2*, des événements de recombinaison



homologue tels que la conversion génique auraient alors pu permettre le passage de copies *VAR1* du NOR2 inactif vers le NOR4 potentiellement actif. Néanmoins, il n'est pas exclu qu'une partie du NOR2 soit devenue partiellement active ce qui pourrait aussi expliquer la présence de transcrits *VAR1* dans le mutant *nuc2*. Cette possibilité est soutenue par l'augmentation du nombre de signaux associés au nucléole observée par FISH.

Toutefois, l'impact fonctionnel de ces séquences polymorphiques au niveau de la région 3'ETS reste encore à déterminer. *Ces variants sont-ils transcrits afin de générer des ribosomes ou bien jouent-ils un rôle dans la stabilité du génome ?*

Dans un premier temps, nous pouvons supposer que les gènes *VAR1* majoritairement non transcrits, chez *A. thaliana* écotype Col-0, pourraient être impliqués dans la stabilité du génome *via* la formation de structures répressives à la transcription. De plus, l'expression du *VAR1* ne semble pas nécessaire pour produire des ribosomes puisque dans les plantes adultes, le *VAR1* n'est pas exprimé (Pontvianne et al. 2010). Néanmoins, il n'est pas exclu que ce dernier puisse jouer un rôle important au cours de certaines étapes développementales ou encore dans des conditions particulières. Pour autant, cela ne signifie pas que les transcrits *VAR1* ne sont pas capables de générer les ARNr 18S, 5.8 and 25S pour faire des ribosomes puisqu'en effet, dans les doubles mutants *atxr5/6*, seuls les gènes *VAR1* sont transcrits (Pontvianne et al. 2012) et donc impliqués dans la formation des ribosomes. De plus, l'écotype *Bur-0* ne possède que des gènes d'ARNr de type *VAR1* ce qui souligne leur capacité à produire des ribosomes (Données personnelles F. Pontvianne). En revanche, nous ne savons pas si ces variants sont associés à du polymorphisme dans les régions codant les ARNr structuraux (18S, 5.8S et 25S). Des variations de séquence pourraient affecter des sites de modification des ARNr, responsables de l'efficacité traductionnelle du ribosome par exemple. Par ailleurs, les protéines ribosomiques sont codées par des gènes issus de familles multigéniques (Barakat et al. 2001). Ces protéines présentent des différences dans leur séquence peptidique ainsi qu'au niveau de leurs modifications post traductionnelles (Chang et al. 2005). Ainsi, il est clair que les ribosomes générés au cours du cycle cellulaire peuvent présenter des compositions différentes. Néanmoins, pour le moment, nous ne savons pas si ces modifications sont à l'origine de particularités fonctionnelles aux ribosomes (Horiguchi et al. 2012).

Plusieurs travaux ont montré que les chaperonnes d'histones NAP1 et CAF-1 sont impliquées dans les processus liés à la recombinaison homologue (Endo et al. 2006; Kirik et al. 2006; Gao et al. 2012). En effet, l'inactivation des protéines FAS1 ou FAS2, sous unités du complexe CAF-1, induit une augmentation de la fréquence des recombinaisons ainsi qu'une réactivation du *VAR1* (Endo et al. 2006; Kirik et al. 2006; Pontvianne et al. 2013). A l'inverse, dans le mutant *Nap1*, une diminution de la recombinaison homologue est observée suite à un défaut d'assemblage des nucléosomes sur la molécule d'ADN (Gao et al. 2012). Etant donné que les protéines nucléoline NUC1 et NUC2 s'associent aux nucléosomes, il n'est pas impossible d'envisager que l'absence de ces protéines puisse affecter la stabilité des ADN, voir d'autres gènes, puisque en leur absence, l'expression de gènes transcrits par l'ARN Pol II est modifiée (Shou et al. 1999; Kojima et al. 2007; Pontvianne et al. 2007; Durut et al. 2014). Une étude des foci  $\gamma$ H2A.X dans les mutants *nuc1* et *nuc2* nous permettra de détecter la présence ou non de cassures d'ADN double brin, site potentiel de recombinaison homologue. Des analyses réalisées sur le mutant *nuc1* ont d'ores et déjà révélé la présence de nombreux foci  $\gamma$ H2A.X (résultats non publiés de F. Pontvianne). Cependant, la question reste encore en suspens concernant le mutant *nuc2*. Il serait aussi intéressant de mettre en place des lignées mutantes *nuc1* et *nuc2* contenant la protéine RAD51 fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) afin de déterminer si des mécanismes de réparation de l'ADN sont fortement sollicités dans les mutants nucléoline étant donné que RAD51 est une protéine impliquée dans les mécanismes de réparation de cassure double brin de l'ADN (Shinohara et al. 1992; Li et al. 2005). De même, des croisements entre les mutants *nuc* et *rad51* pourraient être réalisés afin de déterminer s'il y a une augmentation de la fréquence de recombinaison dans les doubles mutants. Par ailleurs, dans le but d'approfondir cet aspect, nous avons réalisé divers croisements entre les mutants nucléoline et des lignées GUS décrites dans (Endo et al. 2006; Gao et al. 2012) dans lesquelles le gène *GUS* est exprimé de manière plus importante suite à une augmentation des événements de recombinaison. Nous avons actuellement à notre disposition les premières générations de graines issues des croisements.

## Raccourcissement des télomères dans le mutant *nuc1*

Une réduction de la longueur des télomères ainsi qu'une perte du nombre de copie d'ADNr ont été observées dans les mutants *fas* (Mozgova et al. 2010). Au cours de mes travaux, j'ai pu montrer que l'inactivation du gène *NUC1* induit également un raccourcissement de la taille des télomères (Figures 29, 31-32). Cependant, aucune variation du nombre de copies n'a été détectée dans le mutant *nuc1* ; ainsi la perte des copies ADNr dans le mutant *fas* est peut-être indépendante de la diminution de la taille des télomères. De plus, bien que des variations du nombre de copies des variants aient été détectées dans le mutant *nuc2*, aucune différence de taille des télomères n'a été mise en évidence ce qui soutient le fait que la diminution de la longueur des télomères et la perte des ADNr puissent être deux phénomènes bien distincts. Par ailleurs, le nucléole est impliqué dans l'assemblage du complexe télomérase chez les animaux (Tomlinson et al. 2006) et de récents travaux ont montré que la protéine AtTERT chez *A. thaliana* est localisée en partie dans le nucléole (Zachova et al. 2013). Ainsi, il est difficile de conclure quant au rôle direct de NUC1 dans la stabilité des télomères puisque dans le mutant *nuc1* le nucléole est totalement déstructuré (Pontvianne et al. 2007). Les phénotypes observés ne sont alors peut-être pas directement liés à l'absence de la NUC1 mais plutôt à la désorganisation du nucléole d'autant plus, que jusqu'à présent, aucune interaction entre la protéine NUC1 et la télomérase et/ou les séquences télomériques n'ont été mises en évidence chez *A. thaliana*. De manière intéressante, les mutants *nuc1* et *fas* présentent des phénotypes similaires à ceux observés dans les mutants de gènes codant des protéines ribosomiques (Horiguchi et al. 2011). Ceci pourrait alors suggérer un lien éventuel entre les protéines FAS (FASCIATA) et la biogenèse des ribosomes. Ainsi, le processus de biogenèse des ribosomes pourrait être associé au vieillissement cellulaire d'autant plus que le nucléole joue un rôle important dans la senescence (Raska et al. 2006a; Pederson 2011). Il serait alors intéressant de déterminer si dans les mutants *rps*, la longueur des télomères ainsi que l'expression et le nombre de gènes d'ARNr sont affectées.

## La NUC2 est induite en réponse au stress

Au cours de ce travail, nous avons montré que le gène *NUC2* est induit en réponse à la chaleur. Le promoteur du gène *NUC2* est activé et une accumulation de transcrits et de la protéine est détectée à 37°C. Cette induction est peut être en partie associée à la présence d'un élément de réponse à la chaleur (*HSE*) localisé dans le promoteur du gène *NUC2* puisqu'en effet, la mutation de cet élément induit une diminution de l'activité promotrice du gène à 37°C ce qui suggère son potentiel rôle dans la réponse au stress thermique (Abou-Elail 2011). Par ailleurs, cet élément n'ayant pas été identifié dans le promoteur du gène *NUC1*, il semblerait alors que ce dernier soit une caractéristique spécifique au gène *NUC2*. Toutefois, jusqu'à présent, nous n'avons observé aucun défaut de croissance et de développement des mutants *nuc2* en réponse à la chaleur nous permettant d'établir un lien fonctionnel entre la *NUC2* et la réponse au stress thermique (Figures 22-24). Néanmoins, les tests de survie nous ont tout de même permis d'observer une mortalité légèrement plus élevée dans les mutants *nuc2* que dans les plantes sauvages (Figure 23B). Ainsi, peut-être n'avons-nous pas identifié les conditions optimales (c'est-à-dire conditions environnementales et/ou stades de développement de la plante) dans lesquelles l'absence de la protéine *NUC2* pourrait affecter la réponse à la chaleur. Par ailleurs, il est également possible que les effets du stress ne soient visibles que suite à plusieurs générations de plantes stressées. En effet, des travaux menés par DeBolt *et al.* ont montré que des variations du nombre de copie de gènes (CNV : Copy Number Variation) sont induites sur plusieurs générations de plantes suite à un stress thermique (DeBolt 2010).

D'autre part, jusqu'à présent, l'expression du gène *NUC2* en réponse au stress thermique n'a été étudiée qu'au sein de l'écotype Columbia Col-0. Cependant, plusieurs écotypes d'*A. thaliana* sont disponibles de par le monde (principalement dans l'hémisphère nord), provenant ainsi de régions où les conditions climatiques et environnementales sont totalement différentes. De récentes études ont montré que le transcriptome de ces différents écotypes varie en condition de stress thermique (Barah *et al.* 2013a; Barah *et al.* 2013b), et plus particulièrement en réponse au froid où il ressort que le gène *NUC2* est surexprimé dans 8 écotypes sur 10 (Barah *et al.* 2013b). En revanche, d'après les données issues de Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>), il semblerait que

l'expression du gène *NUC2* au sein de ces différents écotypes ne varie pas dans les conditions standards de croissance. Le promoteur du gène *NUC2* dans l'écotype Col-0 contient plusieurs *cis*-éléments, dont les éléments *HSE* et *LTRE*, impliqués dans la réponse au stress thermique. Il serait alors intéressant de déterminer si ces *cis*-éléments sont conservés au sein des autres écotypes et de ce fait, si l'accumulation des transcrits *NUC2* est écotype-spécifique ou bien espèce-spécifique chez *A. thaliana*. D'après les données disponibles sur 1001 genome (<http://1001genomes.org/>), le promoteur du gène *NUC2* semble peu varier entre les différents écotypes dont le génome a été séquencé, ce qui suggère que ces séquences sont conservées au cours de l'évolution entre les différents écotypes d'*A. thaliana*. En revanche, il apparaît que le gène *NUC2* présente plus de variabilité que le gène *NUC1*.

De manière très intéressante, en réponse à la chaleur, l'expression des gènes d'ARNr (Sadis et al. 1988; Tomas et al. 2013), la structure du nucléole (Jacob et al. 2013) ainsi que la localisation de la nucléoline (Daniely et al. 2002) sont modifiées. Chez *A. thaliana*, une accumulation des transcrits ARNr est observée (Figure 26A). Cependant, aucun transcrit *VAR1* n'est détecté ce qui suggère que la température n'induit pas l'activation du NOR2. En parallèle, une accumulation de transcrits inter-géniques, générés à partir de séquences localisées en amont du TIS, a été observée. A l'heure actuelle, le rôle de ces transcrits n'a pas encore été déterminé. Cependant, ces derniers pourraient être à l'origine de la synthèse de petits ou de longs ARN non-codants jouant un rôle important dans la régulation des processus cellulaires en condition de stress. Par exemple, ces ARN pourraient servir de guide pour des complexes de remodelage de la chromatine comme cela a été démontré pour le complexe NoRC chez les animaux (Mayer et al. 2006b; Mayer et al. 2008; Santoro et al. 2010) ou bien ils pourraient participer à la séquestration de protéines dans le nucléole (Audas et al. 2012a; Jacob et al. 2013). De manière intéressante, la méthylation des gènes d'ARNr augmente dans la région 5'ETS des ADNr (Figure 26C) ce qui pourrait alors favoriser la répression transcriptionnelle au niveau du TIS. Les longs transcrits inter-géniques pourraient alors être induits de façon spécifique en réponse aux variations climatiques afin de guider les complexes de répression de la transcription.

Suite à un stress thermique, l'expression des gènes d'ARNr est affectée et le gène *NUC2* est induit. *Quel pourrait alors être le rôle de la protéine NUC2 dans la réponse au stress ?*

Un des rôles potentiels de cette protéine NUC2 pourrait être de modifier l'organisation de la chromatine des gènes d'ARNr en affectant la composition des nucléosomes. Il a été montré que certains variants d'histones jouent un rôle important dans la réponse au stress (Franklin 2010; Kumar and Wigge 2010; Zhu et al. 2012). Le variant d'histone H2A.Z et la méthylation de l'ADN sont deux marques antagonistes (Zilberman et al. 2008; Kobor and Lorincz 2009). Précédemment, nous avons montré que le taux de méthylation des ADNr est modifié en réponse à la chaleur, ainsi, les variations de méthylation observées pourraient s'expliquer par un changement de composition en nucléosomes. De manière intéressante, la méthylation des ADNr est également affectée dans le mutant *nuc2* (Pontvianne et al. 2010; Durut et al. 2014). La protéine NUC2 s'associant aux nucléosomes *in vitro*, il est alors envisageable que cette dernière soit impliquée dans la dynamique nucléosomale en participant à l'incorporation et /ou l'éviction d'histones au sein du nucléosome. Des études d'interaction entre la protéine NUC2 et les histones permettront de répondre à cette hypothèse.

Alternativement, la protéine NUC2 pourrait participer au contrôle de l'expression des gènes d'ARNr *via* une interaction avec le système TOR. Plusieurs travaux ont montré que la voie de signalisation TOR est impliquée dans la régulation de l'expression des ADNr chez la levure, les animaux et les plantes (Li et al. 2006b; Tsang et al. 2010; Ren et al. 2011). Chez *A. thaliana*, la voie TOR est induite en réponse au stress thermique et osmotique (Turck et al. 1998; Mahfouz et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que la protéine ribosomique RPS6, effecteur de la voie TOR, interagit avec l'histone déacétylase AtHD2B pour réprimer l'expression des ADNr (Kim et al. 2014). Un modèle propose que le complexe RPS6/AtHDB2 se fixe sur le promoteur des ADNr *via* l'histone chaperonne NAP1. Ainsi, en réponse à la chaleur, la protéine NUC2 pourrait faciliter ou bien assister l'interaction entre RPS6/AtHDB2 et NAP1 pour contrôler l'expression des ADNr. Une analyse par spectrométrie de masse en condition de stress thermique permettrait d'identifier les interactants potentiels de la protéine NUC2.

## Quel est le rôle des protéines nucléoline dans l'organisation de la chromatine des gènes d'ARNr ?

Les protéines NUC1 et NUC2 s'associent à la chromatine, cependant, seule la protéine NUC1 est capable d'assister le remodelage du nucléosome *in vitro* (Durut et al. 2014). Dans ce contexte, il est raisonnable de proposer que les protéines nucléolines puissent être impliquées dans la dynamique de la chromatine des gènes d'ARNr soit en contrôlant l'accès des complexes de remodelage de la chromatine ou bien en modifiant la dynamique de la chromatine *via* des activités d'histones chaperonnes. D'une part, étant donné que les protéines nucléoline présentent des activités antagonistes, il est alors possible que ces dernières facilitent ou inhibent le recrutement de complexes de remodelage chromatinien activateur ou répresseur. Chez les animaux, les complexes répresseur NoRC et activateur CSB/CSA contrôlent l'expression des ADNr (Santoro et al. 2002; Yuan et al. 2007; Koch et al. 2014). Chez les plantes, à ce jour, aucun homologue du complexe NoRC n'a été identifié. En revanche, chez *A. thaliana*, des orthologues aux protéines composants le complexe activateur CSA ont été identifiées notamment dans les processus impliqués dans la réparation de l'ADN (Biedermann and Hellmann 2010; Zhang et al. 2010b). De même, des homologues aux complexes activateur Trithorax et répresseur Polycomb, impliqués dans le contrôle de la floraison, ont été caractérisés (Pien and Grossniklaus 2007; Buzas et al. 2012). Ainsi, la question se pose concernant les différents types de protéines impliquées dans la régulation par ces différents complexes antagonistes. Des essais d'assemblage de nucléosomes *in vitro*, en présence d'extraits natifs, associés à une analyse par spectrométrie de masse nous permettraient d'identifier des interactants potentiels des protéines nucléoline mais aussi des complexes de remodelage chromatinien. D'autre part, les protéines nucléoline pourraient participer à l'assemblage et aux désassemblages des nucléosomes *via* une activité d'histone chaperonne comme cela a été mis en évidence chez les mammifères (Angelov et al. 2006; Gaume et al. 2011). Des études d'interaction des protéines nucléoline-histones ainsi que la reconstitution de nucléosomes *in vitro* permettront d'étudier le potentiel rôle d'histone chaperonne des protéines NUC1 et NUC2.

De nombreux cas de gènes dupliqués ayant acquis de nouvelles fonctions ont été répertoriés dans la littérature (Charon et al., 2012). Parmi les gènes codants des protéines

impliquées dans la biogenèse des ribosomes, les gènes de la fibrillarine sont très intéressants. En effet, la fibrillarine est, tout comme la nucléoline, codée par deux gènes issus d'une duplication : *AtFIB1* et *AtFIB2* où *AtFIB1* est exprimé plus fortement que son homologue *AtFIB2* (Barneche et al. 2000). La fibrillarine fait partie du complexe U3 snoRNP, qui se lie aux ADNr actifs et participe à la maturation des précurseurs ARNr (Saez-Vasquez et al. 2004b). De manière intéressante, récemment, il a été montré chez l'homme et la levure, que la fibrillarine est capable de méthyle les résidus glutamines de l'histone H2A des gènes d'ARNr (Tessarz et al. 2014). Cette méthylation semble être nécessaire pour la liaison du complexe FACT. Chez les plantes, la fibrillarine méthyle les ARNr grâce à son activité méthylase (Barneche et al. 2000). En conséquence, *la fibrillarine est-elle également capable de méthyle les histones sur les gènes d'ARNr ?* Si oui, cette dernière pourrait jouer un rôle potentiel dans l'ouverture de la chromatine au moment de la transcription. Ainsi, la modification des histones pourrait affecter l'activité de la nucléoline. Alternativement, la méthylation de la glutamine pourrait permettre l'interaction de la nucléoline avec les gènes d'ARNr ou bien induire la translocation de la nucléoline au cours de la transcription.

En conclusion, au cours de cette étude, nous avons montré que les protéines NUC1 et NUC2 sont impliquées dans l'organisation de la chromatine des gènes d'ARNr et ce *via* des activités antagonistes. En effet, la mutation du gène *NUC1* induit une hypométhylation des ADNr alors qu'au contraire, la mutation du gène *NUC2* induit une hyperméthylation des ADNr. Par ailleurs, la protéine NUC1 s'associe aux gènes actifs alors que les résultats obtenus concernant la protéine NUC2 suggèrent que cette dernière participe à la formation de l'hétérochromatine, associée aux gènes inactifs. Ces résultats sont assez surprenants car il est inattendu que des gènes dupliqués puissent présenter des fonctions antagonistes d'autant plus que la double mutation *nuc1nuc2* est létale. Il est alors envisageable qu'au cours de l'évolution certaines fonctions entre les deux protéines aient divergées et d'autres, aient été conservées ce qui permet par exemple, d'expliquer que l'absence d'une des deux protéines ne soit pas létale.

En parallèle, nous avons mis en évidence une induction du gène *NUC2* en réponse à la chaleur, cependant, la question reste en suspens concernant son rôle dans la réponse au stress. Ainsi nous pouvons nous demander si le gène *NUC2* est à mi-chemin d'une nouvelle fonctionnalisation?



Suite à ces travaux, les perspectives envisagées à court terme seront de déterminer les mécanismes impliqués dans la réactivation du *VAR1* dans le mutant *nuc2*. Cette réactivation est-elle associée à des mécanismes de recombinaison homologue ou bien à une activation partielle du *NOR2* ? En parallèle, il est envisagé de déterminer par quels mécanismes les protéines NUC1 et NUC2 participent à l'activation et la répression des gènes d'ARNr. A plus long terme, il serait intéressant de déterminer si les mêmes mécanismes de régulation sont sollicités en réponse au stress thermique.

Par ailleurs, suite à ce travail, nous avons mis en place de nouveaux outils moléculaires permettant de mieux comprendre le rôle du nucléole dans la réponse au stress. Le nucléole est un compartiment très dynamique dont la structure varie en fonction des différentes conditions cellulaires, développementales et environnementales. Les gènes d'ARNr sont aussi importants dans la fonction du nucléole. Nous avons à notre disposition des mutants ADN-T présentant des variations dans les profils d'expression des gènes d'ARNr et des modifications de la longueur des télomères. Ces mutants constituent de véritables atouts pour étudier l'impact des gènes d'ARNr et par conséquent du nucléole, dans l'expression génome.

Il est important de rappeler que les plantes sont des organismes sessiles qui doivent constamment s'adapter aux différentes conditions environnementales. Le gène dupliqué *NUC2* pourrait avoir acquis de nouvelles fonctions permettant à la cellule de contrôler plus spécifiquement l'expression des gènes d'ARNr voire celle d'autres gènes dans des conditions développementales et/ou environnementales particulières. L'analyse de différents écotypes d'*A. thaliana* mais aussi de différentes espèces végétales nous permettra sans doute de déterminer si ce gène et sa fonction sont conservés et donc si il présente un intérêt d'un point de vue évolutif.

# Matériels et Méthodes

---

## I- Matériel

### A- Matériel végétal

L'écotype Columbia (Col-0) d'*Arabidopsis thaliana* a été utilisé comme plante de référence pour mener à bien ce travail étant donné d'une part que son génome a été totalement séquencé et d'autre part, qu'une collection de lignées d'insertion ADN-T a été réalisée sur cet écotype et est disponible sur NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center, <http://nasc.life.nott.ac.uk>). Les lignées mutantes *nuc1-1* (SALK\_053590), *nuc1-2* (SALK\_502764), *nuc2-1* (SALK\_542511) et *nuc2-2* (GABI\_178D01) ont été obtenues à partir des banques SALK et GABI. Les mutants *met1-1*, *nrpe1*, *fas1-4* et *fas2-4* nous ont été gentiment donnés par C. Pikaard, T. Lagrange et J. Fajkus.

### B- Souches bactériennes

#### *Escherichia coli*

Les souches bactériennes DH5 $\alpha$  thermo-compétentes (génotype supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyr thi-1 relA1) ont été utilisées pour réaliser des amplifications de plasmide suite à différents clonages.

Pour l'expression des protéines recombinantes, les souches BL21 (DE3) One Shot<sup>R</sup> (Invitrogen) inductibles à l'IPTG ont été utilisées.

#### *Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58C1 a été utilisée pour réaliser les transformations de plantes. Cette dernière est résistante à la rifampicine et contient le plasmide pMP90 résistant à la gentamycine.

### C- Milieux de culture

#### Milieu de culture pour matériel végétal

Les graines sont semées sur le milieu Murashige et Skoog (MS; Duchefa) utilisé à 4.7 g/L additionné de saccharose (10 g/L), MES (0.5 g/L) et plant agar (10 g/L). Le pH de la

solution est ajusté à 5.7 avec une solution de KOH à 1 M. En fonction des conditions de culture, les antibiotiques suivants peuvent être ajoutés :

- Kanamycine (Duchefa) : utilisée à 50 µg/ml à partir d'une solution stock à 50 mg/ml
- Hygromycine (Duchefa) : utilisée à 30 µg/ml à partir d'une solution stock à 30 mg/ml

### Milieu de culture pour bactéries

Les bactéries sont cultivées dans le milieu Luria Bertani (LB) composé d'extrait de levure (5 g/L), de Bacto Tryptone (10 g/L), de NaCl 10 g/L, le tout ajusté à pH 7.2. Pour les milieux solides, du LB Agar à 15 g/L est ajouté. Si nécessaire, le milieu est additionné de un ou plusieurs antibiotiques à une concentration finale de 1X :

- Ampicilline (Duchefa) : solution stock 100 mg/ml
- Kanamycine (Duchefa) : solution stock 50 mg/ml
- Gentamycine (Sigma) : solution stock 50 mg/ml
- Rifampicine (Duchefa) : solution stock 50 mg/ml (dans DMSO)

## II- Méthodes de physiologie végétale

### A- Culture du matériel végétal

#### Stérilisation des graines et culture *in vitro*

Avant d'être semées *in vitro*, les graines sont stérilisées sous une hotte dans une solution contenant de l'éthanol à 70% et 0.05% de SDS. Les graines sont ensuite rincées dans de l'éthanol absolu puis séchées sous hotte à flux laminaire.

Les graines stérilisées sont semées sur boîtes de Pétri contenant le milieu MS additionné ou non d'antibiotiques. Afin de synchroniser leur germination, les cultures sont préalablement placées 48 h en chambre froide (4°C) avant d'être transférées en chambre de culture (lumière continue à 5000 Lux et température à 22°C).

#### Culture sur terre

Les graines sont semées sur terre (contenant 1 volume de vermiculite pour 3 volumes de terreau) puis déposées 48 h en chambre froide. Ensuite, les semis sont

transférés en chambre de culture à 22°C en jour long (16 h/8 h) avec une intensité lumineuse de 6000 Lux.

### **Stress thermique**

Pour le stress thermique, les plantules de 15j sont placées à 22°C (contrôle) et à 37°C (stress) pendant 24 h en lumière continue et les plantules de 4j sont placées à 30°C pendant 10j. Pour le stress au froid, les plantules de 2j sont placées à 15°C pendant 7j ou 15j en lumière continue.

## **B- Croisements**

Pour les parents femelles, seuls les boutons floraux non ouverts sont sélectionnés alors que les fleurs et les siliques sont détachées de la plante. Par la suite, l'ensemble des pièces florales du bouton est retiré à l'exception du pistil, organe femelle. Pour les parents mâles, les jeunes fleurs sont prélevées et pincées à la base des pétales afin d'ouvrir la fleur. Les grains de pollen matures sont utilisés pour polliniser manuellement les fleurs précédemment émasculées. Les graines des siliques sont par la suite récupérées, semées puis analysées.

## **C- Transformation des plantes par *A. tumefaciens***

### **Transformation et sélection des agro bactéries**

2 µg de plasmide binaire à transformer sont incorporés dans 100 µl d'agro bactéries (compétentes gelées) suite à un choc thermique de 5 min à 37°C. 1 ml de LB est ajouté puis les cellules sont incubées à 28°C pendant 3- 4 h sous agitation. Après centrifugation (3 min à 10 000 rpm), le culot est repris dans 100 µl de surnageant et est étalé sur boîte de LB agar additionnée des antibiotiques appropriés (rifampicine et gentamicine pour les agro bactéries et agent de sélection spécifique pour le plasmide). Les boîtes sont alors incubées pendant 48 h à 28°C puis les clones analysés par PCR.

## Transformation des plantes et sélection

La transformation repose sur la méthode d'inoculation au Silwet décrite par Clough et Bent (Clough and Bent 1998). Le Silwet est un agent puissant mouillant qui facilite la pénétration des agro bactéries dans les plantes.

Un à deux clones d'agro bactéries sont isolés et cultivés, dans 5 ml de LB liquide additionné d'antibiotiques, pendant toute la nuit à 28°C. 2 ml de cette pré-culture est utilisée pour ensemercer la culture finale de 250 ml (contenant les antibiotiques), incubée pendant 24 h à 28°C. Les bactéries sont culotées par centrifugation (15 min à 20°C, 3000 g) et reprises dans 5 ml de **Tampon 1**. La  $DO_{600nm}$  est ajustée à 0.8 à l'aide du **Tampon 2** puis la culture est laissée au repos pendant 1 h sous faible agitation avant la transformation des plantes. Les fleurs sont immergées dans la suspension bactérienne pendant 90 secondes puis entourées de film plastique de type « Saran Wrap » afin de les protéger de la dessiccation. Après 48 h à l'obscurité, les plantes sont replacées en chambre de culture. Les graines sont par la suite récoltées puis semées sur milieu sélectif.

Tampon 1 : ½ MS, 5% glucose

Tampon 2 : ½ MS, 5% glucose, Silwet L7-7 et Acétosyringone 200 µM

## III- Méthodes de biologie moléculaire

### A- Techniques relatives à l'ADN

#### 1- Extraction de l'ADN

##### a- Extraction d'ADN génomique

Au cours de ce travail de thèse, deux techniques d'extraction d'ADN ont été utilisées en fonction de la qualité requise de l'ADN :

#### **Extraction rapide d'ADN**

Cette méthode est souvent employée pour extraire de l'ADNg rapidement en vue d'analyses PCR pour faire par exemple du génotypage.

Un petit morceau de feuille est prélevé sur des plantules de 7j puis déposé dans un petit tube eppendorf contenant 150 µl de **tampon d'extraction**. Les tubes sont incubés à 100°C pendant 10 min puis centrifugés 8 min à 5000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis l'ADN est précipité par un volume équivalent d'isopropanol (~120 µl) avant d'être incubé 15 min à température ambiante. Après centrifugation (15 min, 5000 g), le culot est lavé à l'éthanol 70 % et centrifugé 5 min à 10 000 g. Le culot est séché à 55°C pendant 10 min puis repris dans 50 µl de **tampon d'élution**. Afin de re-suspendre correctement le culot, l'ADN est chauffé 10 min à 55°C puis conservé à 4°C.

Tampon d'extraction : 200 mM Tris pH8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS

Tampon d'élution : 10 mM Tris pH8

### **Extraction d'ADN par kit :**

L'ADNg est extrait à l'aide du kit « DNA Easy Plant Mini Kit » (Qiagen), selon les directives du fabricant, en vue d'obtenir de l'ADN de très bonne qualité pour réaliser des clonages et du séquençage bisulfite. La concentration de l'ADN est déterminée par dosage au spectrophotomètre à 260 nm à l'aide du Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

#### **b- Extraction d'ADN plasmidique**

Des mini préparations de culture bactériennes (DH5α) de 5 ml sont menées à saturation après incubation sur la nuit à 37°C puis culotées par centrifugation (5 min à température ambiante, 6500 g). L'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit « Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System » (Promega) selon les directives du fabricant.

## **2- Electrophorèse**

Les fragments d'ADN (plasmides, ADNg ou produits PCR) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose **TBE 0.5X**, à différentes concentrations d'agarose selon la taille des fragments à séparer, dans lequel est ajouté l'agent intercalant RedGel (Biotum) à une concentration finale de 1/1000<sup>ième</sup>. Le marqueur de taille 1Kb Plus DNA Size Ladder (100 ng/µl, Gibco) est utilisé pour estimer la taille des fragments d'ADN sur le gel. La migration est réalisée entre 50 et 130 V dans du tampon TBE 0.5X.

TBE 0.5X : 45 mM Tris base, 45 mM Acide borique, 1 mM EDTA pH8

### 3- PCR

La PCR ou « Polymerase Chain Amplification » est une réaction permettant l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN délimité par deux amorces (ou oligonucléotides). Ces réactions sont réalisées dans les appareils PCR PTC-200 (MJ Research).

Pour la réalisation de clonage, les PCR sont réalisées avec une enzyme dite à haute-fidélité la « Phusion™ High Fidelity DNA polymerase » (Finnzymes). Cette enzyme thermorésistante permet une meilleure amplification de l'ADN avec un taux d'erreur 50 fois moins important qu'avec la *Taq* polymérase et 6 fois moins important qu'avec la *pfu* polymérase. La réaction de PCR est réalisée dans le mélange suivant (20 à 50 µl final):

- 1X de tampon phusion HF
- 200 µM dNTPs
- 0.5 µM de chaque oligonucléotide
- 50-100 ng d'ADN matrice
- 0.02 U/µl enzyme phusion
- Qsp eau distillée

Le programme utilisé est composé d'une première étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 min, suivie de 25-35 cycles d'amplification (dénaturation : 95°C 45sec, hybridation : 50-60°C 45 sec, élongation : 72°C pendant une durée variable selon la taille du fragment (1 min/Kb)). Une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 min vient clôturer le programme.

Pour les autres types d'amplification PCR (par exemple, PCR sur colonies, ADNg ou ADNc), la « GoTaq Polymerase » (Promega) est utilisée selon le mélange réactionnel suivant (20-50 µl final):

- 1X tampon GoTaq
- 10 µM de dNTPs
- 0.5 µM de chaque oligonucléotide
- Une quantité variable d'ADN matrice



- 0.5 à 1 U d'enzyme ADN polymérase
- Qsp eau distillée

Le programme utilisé est le même que celui décrit ci-dessus.

Pour la PCR quantitative, le kit « MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR assay » (Eurogentec) est utilisé. La réaction est réalisée dans un volume final de 10  $\mu$ l contenant 5  $\mu$ l de mix MESA, 1  $\mu$ l de chaque oligonucléotide (soit 5  $\mu$ M) et 3  $\mu$ l d'ADN (dilué X fois en fonction de la concentration souhaitée). Les échantillons sont déposés en tri-pliquats sur plaque de 96 puits, puis analysés par le LightCycler 480 (Roche). Les amplifications sont réalisées selon le programme suivant : une incubation de 95°C 10 min suivie de 45 cycles (dénaturation : 95°C 10 sec, hybridation : 60°C 10 sec et élongation : 72°C 15 sec) puis une extension finale de 72°C pendant 10 min. L'actine est utilisée comme gène de référence. Les résultats sont analysés en utilisant la méthode comparative CT à l'aide du logiciel d'analyse LightCycler Software 3.3.

La quantification de chaque variants des gènes d'ARNr n'est pas faisable en qPCR en raison de la faible différence nucléotidique au sein des motifs répétés. Pour déterminer l'abondance relative de chacun de ces variants, des PCR semi quantitatives ont été réalisées puis migrées dans le système LabChip PCR GX/GX II (Caliper ; Life Science) qui permet de mesurer l'intensité de chaque produit PCR grâce à la présence d'une molécule fluorescente dans le mélange réactionnel. Les résultats sont, par la suite, analysés à l'aide du logiciel LabChip GX.

La liste des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail est présentée dans la Table 4.

#### **4- Méthode de clonage**

Le clonage est une technique de biologie moléculaire très utilisée qui s'effectue en plusieurs étapes :

##### **Amplification du fragment d'ADN**

Le fragment d'ADN à cloner est amplifié par PCR *via* des oligonucléotides contenant des sites de restriction (si le clonage nécessite une étape de digestion).

| Nom                  | Séquence                             | Taille | Observation                |
|----------------------|--------------------------------------|--------|----------------------------|
| <i>5'nuc2</i>        | GACGAGGAAACTGTCCCTATG                | 21     | <i>NUC2</i> CDS            |
| <i>3'nuc2</i>        | CTACTCTTCATCATTAAAGACCG              | 23     | <i>NUC2</i> CDS            |
| <i>5'nuc2a</i>       | GAACACATTGGCGAGAAATG                 | 20     | EMSA                       |
| <i>3'nuc2a</i>       | GAACCGTCCACGTTTCAAGCG                | 21     | EMSA                       |
| <i>5'nuc2b</i>       | GTCAAGTGTCTAGAGAATCAC                | 21     | EMSA                       |
| <i>3'nuc2b</i>       | CAGCTAGGTTTACGAGAAGC                 | 20     | EMSA                       |
| <i>5'nuc2c</i>       | CAGAAGCCAATCTCTCTCTAC                | 21     | EMSA                       |
| <i>3'nuc2c</i>       | GAAGCAGGTGTTTCAACCTG                 | 20     | EMSA                       |
| <i>5'nuc1</i>        | CCAAGAAGCCCGCAGCTGCTG                | 21     | <i>NUC1</i> CDS            |
| <i>3'nuc1</i>        | CTACTCGTCACCGAAGGTAGTC               | 22     | <i>NUC1</i> CDS            |
| <i>5'HSP70</i>       | GACACCACAATTCCGACC                   | 18     | <i>HSP70</i> CDS           |
| <i>3'HSP70</i>       | AGGTGTGTCGTCATCCATTC                 | 20     | <i>HSP70</i> CDS           |
| <i>5'EF1α</i>        | CTAAGGATGGTCAGACCCG                  | 19     | <i>EF1α</i> CDS            |
| <i>3'EF1α</i>        | CTTCAGGTATGAAGACACC                  | 19     | <i>EF1α</i> CDS            |
| <i>5'actine</i>      | GCCATCCAAGCTGTTCTCTC                 | 20     | <i>Actine</i> CDS          |
| <i>3'actine</i>      | CCCTCGTAGATTGGCACAGT                 | 20     | <i>Actine</i> CDS          |
| <i>5'3ets</i>        | GACAGACTTGTCCAAAACGCCACC             | 25     | 3'ETS ADNr                 |
| <i>3'3ets</i>        | CTGGTCGAGGAATCTGGACGATT              | 24     | 3'ETS ADNr                 |
| <i>5'25s</i>         | GTCGCTAAGATTTCGAC                    | 16     | 25S ADNr                   |
| <i>5'AtHind110</i>   | CCAAGCTTGATCCTTATGATGCATGC           | 27     | Prom ADNr                  |
| <i>3'At5'ETS+228</i> | GCAAGCCATTCTCCTCGACG                 | 21     | 5'ETS ADNr                 |
| <i>5'flcq</i>        | CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTGAG            | 26     | qPCR                       |
| <i>3'flcq</i>        | CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG                | 21     | qPCR                       |
| <i>5'actineq</i>     | GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG              | 23     | qPCR                       |
| <i>3'actineq</i>     | AACGACCTTAATCTTCATGCTGC              | 23     | qPCR                       |
| <i>5'18Sq</i>        | CGTAGTTGAACCTTGGGATG                 | 20     | qPCR                       |
| <i>3'18Sq</i>        | CACGACCCGGCCAATTA                    | 17     | qPCR                       |
| <i>5'25Sq</i>        | GCATCAGGTCTCCAAGGTG                  | 19     | qPCR                       |
| <i>3'25Sq</i>        | AGCCCTCAGAGCCAATC                    | 17     | qPCR                       |
| <i>5'its1q</i>       | GTATCGGCATGCTCGGG                    | 17     | qPCR                       |
| <i>3'its1q</i>       | TTCGTTTGCATGTTCTTGAC                 | 21     | qPCR                       |
| <i>3'Nuc2_Gabi4</i>  | CTGCTTTGCATTAGATTTCTGCTTGC           | 27     | Analyse mutant <i>nuc2</i> |
| <i>LB8409</i>        | ATATTGACCATCATACTCATTGC              | 23     | Insertion ADN-T            |
| <i>5'U3</i>          | CGACCTTACTGAACAAGATCTGTTG            | 26     |                            |
| <i>3'U3</i>          | CTGTCAGACCGCCGTGCGA                  | 19     | Extension d'amorce         |
| <i>Tis</i>           | CCTCGTGCCGATATCCGATACCATCCC          | 27     | Extension d'amorce         |
| <i>P</i>             | CCGATCACCCTCATAACCCGAAC              | 24     | Extension d'amorce         |
| <i>SP1</i>           | GCATTCCTCGACCCGATTG                  | 20     | Extension d'amorce         |
| <i>SP2</i>           | CTCGACGATTCCAAGTCCAG                 | 20     | Extension d'amorce         |
| <i>5'-315</i>        | GGATATGATGYAATGTTTTGTGATYG           | 26     | Bisulfite                  |
| <i>3'+243</i>        | CCCATTCTCCTCRACRATTCARC              | 23     | Bisulfite                  |
| <i>Bis3'ets_fwd</i>  | TGGATAGTGAGAATAATAAGTGAAGAG          | 27     | Bisulfite                  |
| <i>Bis3'ets_rev</i>  | TCATCCATCATTTAATACTAATTCT            | 25     | Bisulfite                  |
| <i>5'-250</i>        | CAAGCAAGCCCATCTCCTC                  | 20     | FISH                       |
| <i>3'+250</i>        | CAACTAGACCATGAAAATC                  | 19     | FISH                       |
| <i>Atprom45S</i>     | AATAGCCCTTTTCCCTCTTGGCACCAACAGACATTG | 36     | Northern Blot              |
| <i>U6</i>            | GGACCATTTCTCGATTTATGCG               | 22     | Northern Blot              |
| <i>5'5s</i>          | CTTTTCGGGCNTTTTNGTG                  | 19     | McrBC                      |
| <i>3'3s</i>          | CGAAAAGGTATCACATGCC                  | 19     | McrBC                      |

|                      |                                    |    |                    |
|----------------------|------------------------------------|----|--------------------|
| <i>5'AtLINE</i>      | CCGATGGTGACCAAGAGTTT               | 20 | McrBC              |
| <i>3'AtLINE</i>      | TCAATGTCGGAGACCTCCTC               | 20 | McrBC              |
| <i>5'AtSN1</i>       | TGTCTTGAAAGGATATTGGAAG             | 23 | McrBC              |
| <i>3'AtSN1</i>       | AAGTGGTGGTTGTACAAGCC               | 20 | McrBC              |
| <i>5'NUC intron</i>  | GATGATTGGATTYATTTTTGG              | 21 | Bisulfite          |
| <i>3'NUC2intron</i>  | CAAAAACATACATAATCCCATC             | 22 | Bisulfite          |
| <i>5'promNUC2</i>    | YTTGGGAGTYAAGTGYTAG                | 20 | Bisulfite          |
| <i>3'promNUC2</i>    | CTTRCCCATARATCCTRATC               | 20 | Bisulfite          |
| <i>5'Ndel H2A.Z</i>  | catATGTCGGGGAAAGGTGCTAA GG         | 26 | Clonage pET16b     |
| <i>3'BamHI H2A.Z</i> | ggatccCTATTCCTTGCGGATTTGTTG        | 28 | Clonage pET16b     |
| <i>5'Ndel H2A</i>    | catatgATGGCGGGTCGCGGCAAAACT        | 27 | Clonage pET16b     |
| <i>3'BamHI H2A</i>   | ggatccCTAATCTTCATCAGCGGAAGG        | 27 | Clonage pET16b     |
| <i>5'Ndel H3</i>     | catATGGCTCGTACCAAGC                | 19 | Clonage pET16b     |
| <i>3'BamHI H3</i>    | ggatccTTAAGCACGTTCTCCACG           | 24 | Clonage pET16b     |
| <i>5'Ndel H4</i>     | catATGTCAGGTCGTGAAAGGG             | 23 | Clonage pET16b     |
| <i>3'BamHI H4</i>    | ggatccCTAGCCGCCGAATCCGTAGAG        | 27 | Clonage pET16b     |
| <i>T7</i>            | TAATACGACTCACTATAGGG               | 20 | Amorce Universelle |
| <i>SP6</i>           | ATTTAGGTGACACTATA                  | 17 | Amorce Universelle |
| <i>REV</i>           | GGAAACAGCTATGACCAGT                | 19 | Amorce Universelle |
| <i>M13</i>           | GTA AACGACGGCCAGT                  | 17 | Amorce Universelle |
| <i>T7term</i>        | GCTAGTTATTGCTCAGCGG                | 19 | Amorce Universelle |
| <i>PETRA-T</i>       | CTCTAGACTGTGAGACTTGGACTACCTAAACCCT | 35 | Analyse télomère   |
| <i>PETRA-A</i>       | CTCTAGACTGTGAGACTTGGACTAC          | 25 | Analyse télomère   |
| <i>1L</i>            | AGGACCATCCCATATCATTGAGAGA          | 25 | Analyse télomère   |
| <i>1R</i>            | CTATTGCCAGAACCTTGATTCAT            | 25 | Analyse télomère   |
| <i>2R</i>            | CAACATGGCCATTTAAGATTGAACGGG        | 28 | Analyse télomère   |
| <i>2L</i>            | TTCGCTCGCCGTTACTAAGGGAAT           | 24 | Analyse télomère   |
| <i>3L</i>            | CATAATTCTCACAGCAGCACCGTAGA         | 26 | Analyse télomère   |
| <i>3R</i>            | CTGTTCTTGAGCAAGTGACTGTGA           | 25 | Analyse télomère   |
| <i>4R</i>            | TGGGTGATTGTCTATGCTACATGGTA         | 25 | Analyse télomère   |
| <i>4L</i>            | TCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCT            | 24 | Analyse télomère   |
| <i>5R</i>            | CAGGACGTGTGAAACAGAACTACA           | 25 | Analyse télomère   |
| <i>5L</i>            | AGGTAGAGTGAACCTAACACTTGGA          | 25 | Analyse télomère   |
| <i>TR4C</i>          | CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAA       | 28 | Analyse télomère   |

**Table 4 :** Liste des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail

Pour les fragments d'ADN amplifiés avec la Phusion ADN polymérase, il est nécessaire de rajouter une queue PolyA (pour cloner par exemple dans le pGEM-T Easy). La réaction se fait alors dans un volume final de 50 µl contenant :

- 20 µl de produit PCR
- 10 µl de tampon GoTaq (5X)
- 1 µl de dATPs (100 mM)
- 1 µl enzyme *Go Taq* (5 U/µl)
- Qsp 50 µl eau distillée

Le mélange est incubé pendant 30 min à 72°C et conservé à -20°C.

### Digestion de l'ADN

La solution de digestion contient 500 ng à 4 µg d'ADN (plasmide ou produit PCR), le tampon de digestion convenant aux enzymes choisies et 5 à 10 Unités d'enzyme. Les réactions de digestion s'effectuent à 37°C pendant 2-4 h en fonction de l'enzyme, de la quantité d'ADN et du type d'ADN. Les produits digérés sont par la suite déposés sur gel et purifiés.

### Purification de l'ADN

Les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose par migration électrophorétique et visualisés sous lumière UV grâce au gel red. Ces derniers sont alors excisés à l'aide d'une lame puis l'ADN est extrait et purifié à l'aide du kit « GENECLEAN<sup>R</sup> Turbo kit » selon les indications du fabricant. Pour terminer, les fragments d'ADN et/ou les plasmides purifiés sont dosés sur gel d'agarose à l'aide du marqueur de taille étalonné 1Kb Plus.

### Ligation de l'ADN

La ligation se fait généralement selon un rapport insert/vecteur de 3/1 ou de 5/1 avec la « T4 ADN ligase » (Promega). La ligation s'effectue à 4°C sur la nuit ou bien à température ambiante pendant environ 3 h.

La ligation dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega) se fait selon le protocole suivant :

- 5 µl de tampon de ligation 5X
- 1 µl de plasmide pGEM-T Easy
- 1 à 3 µl de produit PCR purifié
- 1 µl d'enzyme T4 ligase
- Qsp 10 µl avec de l'eau distillée

Les échantillons sont incubés sur la nuit à 4°C.

### Transformation des cellules

La transformation des cellules DH5α se fait par choc thermique. 50 µl de cellules compétentes sont décongelées sur glace et additionnées de 10 µl de **tampon KCM 5X** et de 50 à 100 ng de vecteur ou de produit de ligation. Le mélange est, par la suite, incubé pendant 20 min sur la glace. Après un choc thermique de 45 sec à 42°C suivi de 2 min de repos sur la glace, 500 µl de milieu liquide LB sont ajoutés avant d'être incubés 30 min à 37°C sous agitation. Pour terminer, 50 µl et 200 µl de la culture sont étalées sur boîtes de LB agar contenant les antibiotiques appropriés et laissées à 37°C toute la nuit.

Tampon KCM 5X : 0.5 M KCl, 0.15 M CaCl<sub>2</sub>, 0.25 M MgCl<sub>2</sub>

Les cellules BL21 sont également transformées par choc thermique. 50 µl de cellules compétentes sont décongelées sur glace et additionnées du produit de ligation, le tout étant mélangé tout doucement par pipetage. Le mélange est par la suite incubé 45 sec à 42°C puis déposé dans la glace pendant 3 min. 500 µl de LB liquide sont ajoutés puis les cellules sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. Pour terminer, la culture est centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min et le culot repris dans 200 µl de surnageant. 50 µl sont étalés sur boîte de LB agar contenant les antibiotiques appropriés et incubés à 37°C toute la nuit.

## 5- Séquençage

Le laboratoire possède dans son enceinte sa propre unité de séquençage. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit « Bid Dye v3.1 » (Applied Biosystems) et du séquenceur « 3130 xl Genetic Analyser » (Applied Biosystems). Les réactions sont préparées dans 8 µl final avec 5 pmol d'oligonucléotides et X ng d'ADN (la concentration

dépendant de la taille du fragment). Les séquences sont par la suite analysées *via* le logiciel Geneious 5.5.7.

## 6- Etude de la méthylation de l'ADN

### a- Séquençage bisulfite

Cette technique repose sur l'utilisation du bisulfite de sodium pour déterminer le profil de méthylation de l'ADN. Ce composé permet la désamination des cytosines en uracile, notamment lorsque les cytosines sont méthylées. Le traitement doit se faire sur de l'ADN extrêmement pure, extrait par exemple avec le kit « DNA easy Plant Mini Kit » (Qiagen).

Pour le séquençage bisulfite des ADNr, en raison de leur forte répétition, l'ADN (500 ng) est au préalable digéré avec l'enzyme BamHI puis précipité avec 1/10 de sodium acétate 3 M et 3 volumes d'éthanol 100. Après centrifugation (5min, 10 000 rpm), le culot est lavé avec de l'éthanol 70 puis séché à l'air libre avant d'être suspendu dans 40 µl d'eau RNase free. La digestion est vérifiée sur gel d'agarose avant traitement.

Dans un premier temps, 500 ng d'ADN est traité à l'aide du kit « Epitect Plus DNA Bisulfite Kit » (Qiagen). Le programme utilisé est le suivant:

- 95°C, 2 min
  - 75°C, 2 h
  - 95°C, 1 min
  - 20°C à durée continue.
- } 8 cycles

Dans un second temps, le traitement des échantillons est repris selon le protocole décrit dans le kit pour récupérer l'ADN convertit. Par la suite, l'ADN est amplifié par PCR avec l'enzyme « Ex Taq HotStart ADN polymérase » (Takara) selon le mélange réactionnel suivant:

- 1.5 µl d'ADN traité
- 2.5 µl tampon Takara 10X
- 1 µl de chaque oligonucléotide (10 µM)
- 2 µl dNTPs (2.5 mM chacun)

- 0.125 µl enzyme Takara 5 U/µl
- Qsp 25µl eau distillée

Le programme PCR utilisé est le suivant: dénaturation à 94°C 5 min suivie de 40 cycles (dénaturation : 94°C 45 sec, hybridation : 50-60°C 45 sec et élongation: 72°C 1 min) puis une extension finale à 72°C pendant 10 min.

Les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose, purifiés avec le kit « GENE CLEAN<sup>R</sup> Turbo kit » puis clonés dans le pGEM-T Easy (Promega) avant d'être transformés dans les cellules DH5α. Après criblage, les échantillons PCR sont traités par Sap-ExoI (0.66 µl rAPID Alkaline Phosphatase (Roche), 0.07 µl Exo I, 5 µl produit PCR et qsp 10 µl avec de l'eau distillée) pendant 30 min à 37°C, 10 min à 80°C et 5 min à 4°C. Ce traitement permet de déphosphoryler les nucléotides qui pourraient interférer avec la réaction de séquençage. Pour finir, 0.5 µl de ce mélange est alors utilisé pour la réaction de séquençage : environ 25 clones sont séquencés pour les gènes non répétés et une centaine pour les ADNr. Les séquences sont nettoyées *via* le logiciel « Geneious » et analysées avec l'outil CyMATE.

#### b- Digestion McrBC

La digestion McrBC est une technique qui permet de détecter les changements de méthylation dans des régions géniques. McrBC est une endonucléase capable de cliver l'ADN méthylé dans le contexte ((G/A)<sup>m</sup>C). Suite à la digestion, seul l'ADN non méthylé est amplifié par PCR.

Tout d'abord, 50 ng d'ADN est digéré avec l'enzyme McrBC (Qiagen) selon le mix suivant :

- 10 µl buffer 10X
- 1 µl GTP 100X
- 1 µl BSA 100X
- Qsp eau distillée 100 µl.

Le mélange est incubé 4 h à 37°C avec ajout de 0.5 µl d'enzyme après 2 h d'incubation. Pour terminer, une amplification PCR est réalisée avec l'enzyme « HotStart Go taq » (Promega). Différents nombres de cycles PCR sont réalisés afin d'obtenir des signaux non saturés. En contrôle, le mutant *nrpe1*, totalement déméthylé, est utilisé.

## 7- FANoS

Cette technique consiste à séparer les nucléoles des noyaux grâce à la fluorescence d'une protéine nucléolaire: la fibrillarine. Pour cela, des plantes sauvages Col-0 ont été croisées avec des plantes dans lesquelles la fibrillarine a été fusionnée au gène rapporteur YFP (Yellow Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur 35S CMV (CytoMegaloVirus). Après génotypage et vérification au microscope, les générations F3 sont utilisées pour extraire les nucléoles. Les feuilles de plantules de 3 semaines sont récupérées et fixées 20 min dans un **tampon Tris** froid contenant 4% de formaldéhyde. Après deux rinçages de 10 min dans du tampon Tris froid, les feuilles sont hachées à l'aide d'une lame de rasoir dans 500 µl de **tampon FACs** puis le liquide est filtré sur la glace à travers un filtre de 30 µm « CellTrics<sup>R</sup> » (Partec). Le filtrat est alors récupéré et soniqué à l'aide du bio-rupteur UCD-200 (Diagenode) (3 cycles de 5 min avec 30 sec d'intervalle) afin de casser les noyaux et de libérer les nucléoles. 2 µl/ml de DAPI sont ajoutés aux échantillons avant que les noyaux ne soient séparés des nucléoles *via* le trieur ARIA II (BD Bioscience) localisé à Montpellier. Pour terminer les échantillons sont amplifiés par PCR afin de détecter les ADNr associés aux nucléoles.

Tampon Tris : 10 mM Tris HCl pH7.5, 10 mM NaEDTA, 100 mM NaCl

Tampon FACs : 45 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MOPS pH7, 30 mM citrate de sodium et 0.1% de triton X-100

## 8- Analyse de la longueur des télomères par Southern bot

Deux techniques ont été utilisées pour déterminer la longueur des télomères :

### a- Méthode TRF « Telomere Restriction Fragment » :

2.5 µg d'ADNg (dans un volume final de 20 µl) sont digérés avec l'enzyme MseI 1 h à 37°C dans un volume final de 50 µl. La totalité de l'ADN digéré est migré sur gel d'agarose à 0.8 %, à 25 V sur toute la nuit.



b- Méthode PETRA « Primer Extension Telomere Repeat Amplification » :

Cette technique est réalisée en deux étapes : tout d'abord, l'adaptateur PETRA-T est ajouté à l'ADNg par amplification PCR selon les indications suivantes :

- 500 ng d'ADN dans un volume final de 13 µl
- 2 µl de buffer 10X
- 1 µl de dNTPs (2.5 mM chacun)
- 2 µl PETRA-T (10 µM)
- 0.4 µl enzyme « EX Taq Hot Start DNA Polymerase » (Takara)
- 7 µl eau distillée

Programme : 65°C 5 min, 55°C 1 min et 72°C 10 min.

La deuxième étape consiste à ajouter le primer PETRA-A et à amplifier la région télomérique d'intérêt par PCR :

- 1 µl du produit PCR PETRA-T
- 2 µl tampon 10X
- 1.6 µl dNTPs (2.5 mM chacun)
- 0.5 µl PETRA-A (10 µM)
- 0.5 µl primer (10 µM)
- 0.1 µl enzyme « EX Taq Hot Start DNA Polymerase » (Takara)
- Qsp 20µl eau distillée.

Programme: 96°C 2 min, 16 cycles (96°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2.5 min) et 72°C 10 min.

Les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose à 0.8% et séparés par migration sur la nuit à 25 V. Le marqueur de taille 1Kb Plus est déposé sur le gel puis photographié afin de pouvoir visualiser le marqueur et déterminer par la suite la taille des fragments d'ADN.

**Préparation de la sonde**

La sonde est marquée au  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3000 Ci/mmol) *via* la « T4 Polynucleotide Kinase » (Promega) selon le mélange réactionnel suivant:

- 5 µl ADN (oligonuclotides) 10 µM
- 2 µl tampon PNK 10X

- 1 µl enzyme T4 Kinase
- 5 µl γATP
- 8 µl eau distillée

Le mélange est incubé 1h30 à 37°C puis la sonde est purifiée sur une colonne d'exclusion « Illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns » (GE Healthcare). La sonde est chauffée 2 min à 94°C avant d'être utilisée.

### Southern Blot

Après migration et photographie du gel, ce dernier est lavé dans une solution de HCl 0.25 M pendant 10 min puis rincé 5 min dans de l'eau distillée avant d'être neutralisé dans une solution de NaOH 0.4 M pendant 30 min. Le gel est ensuite transféré pendant au moins 15 h par capillarité dans le tampon NaOH sur une membrane Hybond-N (Amersham) suivant les recommandations du fabricant. Après transfert, la membrane est rincée dans du tampon 2X SSC pendant 10 min puis l'ADN est fixé sur la membrane pendant 2 h à 80°C au four. Ensuite, la membrane est pré-hybridée dans le tampon d'hybridation « PerfectHyb™ Plus Hybridization buffer 1X» (Sigma) à 55°C pendant 2 h. La totalité de la sonde est ajoutée et la membrane est incubée toute la nuit à 55°C. Après l'hybridation, les membranes sont rincées 20 min à 55°C dans un tampon 2X SSC, 0.1% SDS froid puis 2 fois 20 min dans le même tampon mais cette fois ci préalablement chauffé à 55°C. Pour terminer, la membrane est rapidement rincée dans du tampon 2X SSC avant d'être exposée toute la nuit sur un écran PhosphorImager (GE Healthcare). Les signaux sont révélés *via* le scanner PMI (Bio-rad) et quantifiés à l'aide du logiciel « Quantity One 4.6.9 » (Bio-rad).

### 9- EMSA « Electrophoretic Mobility Shift Assay »

Les séquences d'ADN choisies pour réaliser l'EMSA sont amplifiées par PCR, purifiées sur gel d'agarose puis marquées au  $[\gamma\text{-}^{32}]$ ATP *via* la « T4 Polynucleotide Kinase » conformément aux directives du fournisseur. Entre 60 et 200 ng de protéines recombinantes sont incubées 30 min dans la glace avec la sonde radio-marquée dans un **tampon d'incubation**. Par la suite, du **tampon de charge ADN 1X** est ajouté au mélange contenant les complexes protéines-ADN avant migration sur gel 1% agarose TBE 0.5X, 1 h à 200V. Le gel est ensuite séché sous vide *via* le système « Gel Dryer» (Fisher brand) couplé au « Gel Dryer

Vacuum systems » (Fisher Biotech) puis exposé sur la nuit sur un écran phosphorimager avant d'être analysé.

Tampon d'incubation : 10 mM Tris HCl pH7.5, 5% glycérol, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/100 inhibiteurs de protéase « Protease Inhibitor Cocktail For Plant cell and Tissue extract » (Sigma)

Tampon de charge ADN 6X : 10 mM Tris-HCl pH7.6, 0.03% bleu de bromophénol, 0.03% xylène cyanol FF, 60% glycérol, 60 mM EDTA

## B- Techniques relatives à l'ARN

### 1- Extraction d'ARN

Les ARN totaux de plantules sont extraits au Trizol (Amersham Biosciences) selon le protocole suivant : 1 ml de Trizol est ajouté à 100 mg de tissus broyés à l'aide du système « Silamat<sup>R</sup> S6 » (ivoclar Vivadent). Le mélange est incubé 5 min à température ambiante, additionné de 200 µl de chloroforme, agité et à nouveau incubé pendant 3 min à température ambiante avant d'être centrifugé 15 min à 2°C, à 12 000 g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et les ARN sont précipités par l'ajout de 500 µl d'isopropanol puis incubés 10 min à température ambiante. Après centrifugation (10 min à 2°C, 12 000 g), le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70 RNase free puis séché à l'air libre avant d'être repris dans 40 µL d'eau DEPC (RNase free). Pour terminer, les ARN sont dosés au Nanodrop puis conservés à -80°C.

### 2- Migration des ARN sur Gel

La qualité des ARN est vérifiée sur un gel d'agarose à 0.8%. Pour cela, 2.5 µg d'ARN sont mélangés à 15 µl de **tampon ARN** dans un volume final de 20 µL. Les ARN sont alors dénaturés 20 min à 65°C puis 2 à 5 µl de **tampon de charge ARN** sont ajoutés. Le mélange est déposé sur gel d'agarose 0.8% **TAE 1X** puis migré à 75 V pendant 30 min.

Tampon ARN : 65% formamide désionisé, 8% formaldéhyde, 13% **tampon MOPS**

Tampon MOPS : 0.2 M MOPS pH7, 50 mM Acétate de sodium, 5 mM EDTA pH8

Tampon de charge ARN : 5% glycérol, 1 mM EDTA pH8, 0.4% Bleu de Bromophénol, gel red (1/1000)

Tampon TAE 50X : 2 M Tris base, 5.7% acide acétique glacial, 50 mM EDTA pH8

### 3- Traitement des ARN à la DNase

Les ARN sont généralement traités à la DNase afin d'éliminer tout contaminant éventuel d'ADNg. Pour cela, les ARN totaux sont traités à la « Turbo DNase » (Ambion) selon les conditions suivantes :

- 5-10 µg d'ARN
- 5 µl de tampon 10X
- 1 µl d'enzyme « Turbo DNase »
- Qsp 50 µl eau DEPC

Le mélange est incubé 30 min à 37°C. 0.5 µl d'enzyme sont ajoutés puis le mélange est à nouveau incubé 30 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 5 µl de DNase inactivation suivie d'une incubation de 5 min à température ambiante. Par la suite, l'enzyme est extraite au phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25 :24 :1) et les ARN sont précipités à l'éthanol. Pour finir, l'ARN est dosé au Nanodrop à 260 nm puis conservé à -80°C.

### 4- Réaction de Transcription Réverse

Les enzymes transcriptases réverses appelées aussi ADN polymérase ARN dépendantes sont capables de synthétiser un brin d'ADN dit complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice ARN. Tout comme les ADN polymérases, les réverses transcriptases nécessitent des oligonucléotides pour démarrer la synthèse. Ces amorces peuvent être des oligonucléotides spécifiques qui permettent la synthèse d'ADNc à partir d'ARN particulier (Ex : les ARNr), des oligonucléotides généraux appelés oligodT qui ciblent tous les ARNm ou bien des hexamères aléatoires (Random) capables de s'hybrider sans distinction avec tous les ARN. La synthèse débute par la transcription réverse qui génère des ADNc qui seront par la suite amplifiés par PCR. Pour la réaction, 500 ng d'ARN traités à la Turbo DNase sont réverses transcrits à l'aide du kit « GoScript reverse Transcription System » (Promega) : les ARN sont dénaturés et hybridés 5 min à 70°C en présence soit des oligodT (pour les ARNm)

soit d'un oligonucléotide spécifique pour les ARNr et, par la suite, réverse transcrits *via* la rétro transcriptase MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), selon les indications du fournisseur. Généralement, 1 µl d'ADNc est utilisé comme matrice PCR. Les ADNc sont conservés à -20°C.

## 5- Extension d'amorce

Cette technique permet d'analyser et de quantifier des transcrits ARN de façon très précise. Elle se déroule en plusieurs étapes :

### Préparation et marquage du marqueur de taille

500 ng du plasmide pBR322 (Promega) sont digérés avec l'enzyme HpaII 1 h à 37°C. Ensuite, ce dernier est marqué avec l'ADN polymérase « Klenow » (Promega) de la manière suivante :

- 5 µl pBR322 digéré
- 2 µl tampon Klenow 10X
- 1 µl GTP 2 mM
- 2 µl dCTP 10 µCi/µl
- 1 µl enzyme Klenow ADN polymérase
- Qsp 20 µl eau distillée

Incuber 30 min-1 h à température ambiante.

### Marquage oligonucléotide

0.5 µM d'oligonucléotides sont marquées au  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  par la « T4 Polynucleotide kinase » (Promega) dans le mélange réactionnel suivant :

- 1 µl oligonucléotides 10µM
- 2 µl Tampon T4 kinase 10X
- 5 µl  $\gamma\text{ATP}$  (10 mCi/ml, 3000 mmol/ml)
- 1 µl enzyme T4 kinase
- Qsp 20 µl eau RNase free

Incuber 1 h à 37°C. Pour terminer, la sonde est purifiée sur une colonne d'exclusion « Illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns » (GE Healthcare) et conservée à -20°C.

### Extension d'amorce

Le kit « Superscript III reverse Transcriptase » (Invitrogen) est utilisé pour réaliser cette étape. 10 µg d'ARN totaux dans un volume de 6 µl final sont additionnés à 2 µl de tampon Superscript et 2 µl d'amorces radio-marquées au préalable. Le mélange est incubé 5 min à 80°C puis refroidit sur la paillasse jusqu'à ~ 52°C. A ce moment, 10 µl du mélange réactionnel suivant sont ajoutés :

- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 2 µl tampon Superscript 5X
- 2 µl DTT 0.1 M
- 0.5 µl RNAsinhitor (Promega)
- 0.5 µl enzyme RT superscript III
- Qsp 10 µl eau RNase free

L'élongation se fait à 48°C pendant 50 min. Ensuite, 5 µg d'ARNt de levure sont ajoutés aux ARN (afin d'optimiser leur précipitation) puis les ARN sont précipités avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH5.2 et 3 volumes d'éthanol absolu sur la nuit à -20°C. Après centrifugation (20 min, 12000 g), le culot est lavé à l'éthanol 70 puis repris dans 5 µl de **tampon de charge**.

Tampon de charge : 0.1% Bleu de Bromophénol, 0.1% xylène cyan, 10 mM EDTA pH8, 91% formamide

### Migration sur gel

Les produits d'extension d'amorces sont migrés sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 6%. Pour cela, 50 ml d'un mélange contenant 7 M urée, 6% acryl :Bis (19 :1) et 1X TBE sont filtrés à 0.2 µm et additionnés de 300 µl d'APS 10% (Persulfate d'Ammonium) et de 22 µl de TEMED. La solution est immédiatement coulée entre deux plaques de gel de séquences (CBS Scientific Compagny Inc). Une fois polymérisé, le gel est pré-chauffé 1 h à 45 W et les échantillons sont dénaturés 5 min à 100°C avant d'être déposés sur le gel et migrés

1h30 à 45 W. Le gel est par la suite démoulé et récupéré sur une feuille de papier Wathman puis recouvert de film transparent de type « Saran Wrap » avant d'être séché sous vide à 80°C pendant 1 h à l'aide du « Gel Dryer » (Fisher brand) couplé au « Gel Dryer Vacuum System » (Fisher Biotech). Le gel est exposé sur la nuit à un écran PhosphorImager puis analysé.

## 6- Northern blot

### Préparation de la membrane

15 µg d'ARN traités à la Turbo DNase sont mélangés à 5 µl de **tampon de charge 4X**. Les extraits sont mélangés, dénaturés 5 min à 95°C puis refroidis 2-3 min dans la glace avant d'être déposés sur gel d'acrylamide dénaturant à 17.5% (7 M urée, 17.5% acryl : Bis 19 :1, **TBE 0.5X**) préalablement chauffé à 80 V pendant 30 min dans du TBE 0.5X. Après 1h30 de migration à 80 V, le gel est démoulé et transféré sur une membrane de Nylon Hybond-N (Amersham) dans du tampon de migration TBE 0.5X à 20 mA sur la nuit. Pour terminer, la membrane est équilibrée pendant 10 min sur du papier Wathman trempé dans du tampon 2X SSC puis les ARN sont fixées sur la membrane par pontage covalent aux UV *via* le Stratalinker™ 2400 (Stratagène) (1200 Joules X100).

Tampon de charge 4X : 50% Glycérol, 50 mM Tris-HCl pH7.7, 5 mM EDTA, 0.03% bleu de bromophénol

TBE 1X : 90 mM Tris base, 90 mM acide borique, 2 mM EDTA pH8

### Hybridation et révélation

Tout d'abord, la membrane est pré-hybridée pendant 2 h à 42°C dans le tampon d'hybridation « PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer 1X » (Sigma). Ensuite, la sonde radio-marquée à la T4 polymérase kinase est dénaturée 5 min à 95°C puis refroidie dans la glace avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation. L'hybridation se fait sur la nuit à 42°C. La membrane est ensuite lavée deux fois 20 min à 50°C dans du tampon 2X SSC- 2% SDS puis une fois dans du tampon 1X SSC-1% SDS. Pour terminer, la membrane est exposée à un écran PhosphorImager puis révélée.

## C- Techniques relatives aux protéines

### 1- Extraction des protéines

Les protéines sont extraites suivant le protocole standard d'extraction protéique. 100 mg de tissus végétaux sont broyés *via* le système « Silamat<sup>R</sup> S63 (ivoclar Vivadent) et repris dans 500 µl de **tampon d'extraction** auquel sont ajoutés 20 µM de MG132 et 1/100 d'inhibiteur de protéase « Protease Inhibitor Cocktail For Plant cell and Tissue extract » (Sigma). Le mélange est homogénéisé puis centrifugé à 4°C pendant 20 min, 12000 g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré puis dosé par la technique de dosage colorimétrique de Bradford (1976) avec le réactif de Bio-rad. La concentration en protéine est déterminée par comparaison à une gamme étalon établit en utilisant de la BSA (Sigma-Aldrich). Les protéines sont par la suite conservées à -80°C.

Tampon d'extraction protéique : 50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA pH8, 50 mM Nafluoride, 1% NP40, 0.45% Na déoxycholate, 1% SDS.

### 2- Electrophorèse SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel electrophoresis)

Les protéines extraites sont séparées par migration électrophorétique en condition dénaturante dans un gel de polyacrylamide à l'aide du système « Mini Protean tetra Cell » (Bio-rad). Les protéines chargées négativement par le SDS migrent en fonction de leur masse (Laemmli, 1970). Le gel est composé de deux phases : une **phase de concentration** dite « stacking » coulée sur une **phase de séparation** dite « resolving ». Les protéines sont reprises dans du **tampon de charge** puis dénaturées 5 min à 100°C avant d'être déposées dans les pistes du gel. Généralement une des pistes est utilisée pour y déposer 3-5 µl de marqueur de taille « PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder » (ThermoScientific). Les protéines sont alors séparées dans un **tampon de migration** par un courant de 20 mA par gel pendant environ 1 h. Après migration, le gel est démoulé et analysé par coloration ou bien par Western blot.

Phase de concentration : 3% Acrylamide/ Bis-Acrylamide (29 :1), 0.125 M Tris-HCl pH6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED.



Phase de séparation : 5-15% Acrylamide/Bis-Acrylamide (29 :1), 0.375 M Tris-HCl pH8.8, 0.1% SDS, 0.032% APS et 0.04% TEMED.

Tampon de charge 2X: 125 mM Tris-HCl pH6.7, 4% SDS, 20% glycérol, 0.1% bleu de bromophénol et 0.2 M DTT.

Tampon de migration : 25 mM Tris, 192 mM glycine et 0.1% SDS.

### 3- Coloration du gel au bleu coomassie

Le gel est coloré dans une solution au bleu de Coomassie « SimplyBlue™ SafeStain » (Invitrogen) pendant environ 50 min, sous agitation, puis décoloré à l'eau distillée.

### 4- Western blot

Les protéines séparées sur gel sont transférées sur une membrane de nitro-cellulose de 0.45 µm (Bio-rad), pendant 90 min à 100 V, dans du **tampon de Transfert**. La qualité du transfert est vérifiée par une coloration au rouge ponceau (0.5% de ponceau S et 1% d'acide acétique) pendant 5 min. La membrane est, par la suite, rincée abondamment à l'eau distillée avant d'être saturée, pendant 1 h, dans une **solution 1X T-TBS** complétée à 5% de lait en poudre (lait acheté dans un commerce local). Après rinçage au T-TBS, la membrane est hybridée, sur la nuit, dans une solution de T-TBS à 5% en lait à laquelle est ajouté l'anticorps spécifique à la dilution appropriée. La membrane est ensuite lavée, 3 fois 10 min, dans du T-TBS puis incubée, 1 h, en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG, couplé à l'enzyme peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase), dans du T-TBS 5% en lait. La membrane est à nouveau rincée, 3 fois 10 min, dans du T-TBS avant d'être révélée avec le kit « Immobilon » (Millipore). L'hybridation des anticorps est détectée sur un film « CL-XPosure™ Film » (ThermoScientific) suite à une exposition variant de 10 secondes à 30 minutes, en chambre noire et la révélation *via* le développeur automatique « Automatic Autoradiography Film Processor » (Amersham).

Tampon de Transfert : 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% éthanol 95-100

Tampon T-TBS: 20 mM Tris base, 136 mM NaCl, 0.1% Tween-20, ajuster le pH à 7.6 avec une solution de HCl

## 5- Production des protéines recombinantes Histones

### Clonage des séquences

Les séquences codantes des histones H2A, H2A.Z et H3 ont été amplifiées par PCR à partir d'ADNc, à l'aide de l'ADN Polymérase Phusion. Les sites de restriction NdeI et BamHI ont été ajoutés respectivement aux extrémités 5' et 3' de chaque séquence. Après purification, les produits PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy, séquencés, digérés avec les enzymes NdeI et BamHI puis sous clonés dans le plasmide pET16b (Novagen) pour produire les protéines recombinantes His-H2A, His-H2A.Z et His-H3.

### Expression des protéines dans *E. coli*

Après transformation des bactéries BL21 avec le plasmide pET16b contenant les séquences des histones, les bactéries sont cultivées à 37°C dans du milieu LB additionné de l'antibiotique Ampicilline (10 µg/ml) jusqu'à obtenir une absorbance à 600nm de l'ordre de 0.6. 1mM d'IPTG est alors ajouté afin d'induire la production des protéines. Après 1h30 d'induction à 37°C, les bactéries sont centrifugées 15 min à 4°C, 4000 g puis le culot est repris dans 10 ml de **tampon de lyse**. L'expression de la protéine est alors vérifiée par coloration au bleu de Coomassie et/ou par Western blot. Ensuite, les bactéries sont lysées dans le broyeur cellulaire OneShot (Constant Systems Ltd) à une pression de 1350 Bar puis clarifiées par centrifugation (15 min à 4°C, 9000 g). La solubilité des protéines est vérifiée par SDS-PAGE. Les histones, étant insolubles, sont reprises dans du **tampon Binding 1X** additionné de 6 M urée à pH 7.9. Après 1 h d'incubation dans la glace, les protéines sont centrifugées 30 min à 4°C, 16000 g.

Tampon de lyse : 1X tampon Binding, 20 µg/ml de DNase (Sigma), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/100<sup>ième</sup> inhibiteur de protéase « Protease Inhibitor Cocktail For Plant cell and Tissue extract » (Sigma).

Tampon Binding 8X : 40 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH7.9

## Purification des protéines

Les protéines exprimées sont purifiées sur colonne à l'aide du kit « His-Bind<sup>R</sup> buffer Kit » (Novagen). La purification est réalisée en conditions dénaturantes c'est-à-dire en présence de 6 M urée. Le surnageant obtenu après centrifugation est filtré puis déposé sur colonne contenant la résine préalablement lavée et équilibrée selon les instructions préconisées par le fabricant. Par la suite, la colonne est extensivement lavée avec le tampon Binding 1X puis rincée avec le **tampon Wash 1X** tous deux additionnés de 6 M urée. L'élution des protéines se fait par compétition avec de l'imidazole qui est un analogue structural de l'histidine contenu dans le **tampon d'élution** ajouté de 6 M urée. Les fractions récupérées sont dialysées dans de l'eau afin d'éliminer l'urée et de permettre la restructuration des protéines, puis analysées par Western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-histidine.

Tampon Wash 8X : 480 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH7.9

Tampon d'élution 4X : 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH7.9

## D- Analyses histologiques

### 1- Immunocytologie

#### Préparation des échantillons

Les plantules entières ou les feuilles sont fixées 45 min dans une solution de **PME 1X** contenant 4% de para formaldéhyde. Après 3 rinçages de 5 min dans du PME 1X, les tissus (apex racinaires ou cotylédons) sont transférés sur une lame de polysine contenant 50 µl de **produit de digestion** permettant alors la dégradation de la paroi cellulaire. Les lames sont incubées 1h30 à température ambiante puis rincées 3 fois 5 min dans du tampon PME. Les tissus sont alors écrasés entre lame et lamelle puis plongés dans de l'azote liquide. Les lamelles sont retirées à l'aide d'une lame de rasoir et les lames sont conservées à -80°C.

PME 10X : 500 mM PIPES pH6.9, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM EGTA

Solution de digestion : 1% cellulase, 0.5% cytohelicase, 1% pectolyase dans 1X PME

## Immunomarquage

Les lames sont réhydratées 5 min sous agitation dans du tampon PME 1X. Par la suite, les échantillons sont perméabilisés 15 min dans une solution PME 1X contenant 0.5% triton X-100 puis rincés 3 fois 5 min dans du tampon PME sous agitation. Les lames sont ensuite traitées 10 min au méthanol et rincées 10 min puis 3 fois 5 min dans du **PBS 1X**. Les lames sont incubées toute la nuit à 4°C, sur du papier Wathman imbibé d'eau distillée, dans une **solution de blocage** contenant l'anticorps primaire. Après 3 lavages de 5 min dans du PBS 1X, le second anticorps anti-rabbit (conjugué au fluorochrome Alexa-488 (1/200, Invitrogen)), est ajouté pendant 3 h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min dans du PBS 1X, les échantillons sont marqués pendant 5 min dans une solution Vectashield contenant du DAPI (1 µg/ml, Vector Laboratories) puis montés avec une lamelle et scellés avec du vernis avant d'être analysés sous lumière fluorescente au microscope confocal LSM 700 (Zeiss).

PBS 10X: 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajuster le pH à 7.4 avec une solution de NaOH

Tampon de blocage : 1X PBS, 3% BSA, 0.05% Twenn-20

## 2- FISH

### Préparation de la sonde

Utilisation du kit « DIG-Nick translation labeling » (Roche) pour marquer l'ADN à la digoxygénine selon le mélange réactionnel suivant :

- 1 µg ADNg
- 4 µl de mix DIG-Nick Translation
- Qsp 20 µl avec de l'eau distillée

Le mélange est incubé 2h30 à 15°C. 1 µl de 0.5 M EDTA pH8 est ajouté et incubé à 65°C pendant 10 min afin de stopper la réaction. La sonde est alors prête à être utilisée et est conservée à -20°C.

## Préparation des échantillons

Les feuilles de plantules de 4 à 6 semaines sont fixées 20 min sous rotation dans un **tampon Tris** contenant 4% de para formaldéhyde. Après 2 rinçages de 10 min dans du tampon Tris, les feuilles sont hachées à l'aide d'une lame de rasoir dans 500 µl de **tampon LB01**. Le liquide, contenant les noyaux, est alors filtré sur glace à travers un filtre de 30 µm « CellTrics<sup>R</sup> » (Partec). 50 µl de filtrat est transféré dans un nouveau tube et additionné de 100 µl de **tampon Sorting**. 200 µl de ce mélange est étalé soigneusement sur une lame de polysine puis séché à l'air libre. Les échantillons sur la lame sont ensuite fixés 5 min dans du **PBS 1X** contenant 2% de formaldéhyde puis rincés 3 fois 5 min dans du PBS 1X. Après séchage, les lames sont incubées 30 min à 60°C dans un four puis 1 h à 37°C dans une chambre humide en présence de 100 µg de RNase A dans du tampon 2X SSC. Après 3 rinçages de 5 min dans du tampon 2X SSC, les lames sont déshydratées par une succession de bains de concentration croissante en éthanol (3 min éthanol 70, 90 et 100%). Laisser sécher les lames.

Tampon Tris: 10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM NaEDTA, 100 mM NaCl

Tampon LB01 : 15 mM Tris-HCl pH7.5, 2 mM NaEDTA, 0.5 mM spermine, 80 mM KCl, 20 mM NaCl et 0.1% Triton X-100

Tampon Sorting : 100 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20 et 5% glucose

PBS 10X: 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajuster le pH à 7.4 avec une solution de NaOH

## Hybridation et révélation

5 µl de sonde sont ajoutés dans 25 µl de **tampon d'Hybridation**. Le mélange est déposé sur la lame puis recouvert d'une lamelle avant d'être chauffé 3 min à 80°C. Les lames sont incubées à température ambiante toute la nuit, dans une chambre humide contenant du tampon 2X SSC. Les lames sont ensuite rincées successivement 5 min à 42°C dans du tampon 2X SSC, 0.1X SSC, 2X SSC puis 2X SSC-0.1% tween 20 à température ambiante. Les lames sont bloquées pendant 30 min dans du **tampon de Blocage** à température ambiante puis rincées 3 fois 5 min dans une solution de **TBS 1X** Triton 0.1%. Par la suite, la sonde

marquée à la digoxygénine est détectée par l'anticorps primaire Anti-digoxygénine (1/200<sup>ième</sup>, Roche), déposé sur la lame dans la solution **Abdil** et incubé 30 min à 37°C . Après 3 rinçages de 5 min dans du TBS triton 0.1%, l'anticorps secondaire anti-mouse (conjugué au fluorochrome Alexa 488 (1/200<sup>ième</sup>, Invitrogen)) est ajouté et incubé 30 min à température ambiante. Après 3 rinçages de 5 min dans TBS 0.1% triton, une solution Vectashield contenant du DAPI à 1 µg/ml est ajoutée et les lames sont montées et scellées avant d'être observées au microscope confocal.

Tampon d'Hybridation : 50% formamide, 2X SSC, 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH7.0, 10% dextran sulphate

Tampon de Blocage : 5% BSA, 4X SSC

TBS 10X : 200 mM Tris base, 1.36 M NaCl, ajuster le pH à 7.6 avec une solution de HCl

Abdil : 1X TBS, 0.01% Triton X-100, 2% BSA

# Références

---

- Abbasi N, Kim HB, Park NI, Kim HS, Kim YK, Park YI, Choi SB. 2010. APUM23, a nucleolar Puf domain protein, is involved in pre-ribosomal RNA processing and normal growth patterning in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **64**: 960-976.
- Abdelmohsen K, Tominaga K, Lee EK, Srikantan S, Kang MJ, Kim MM, Selimyan R, Martindale JL, Yang X, Carrier F et al. 2011. Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic acids research* **39**: 8513-8530.
- Abou-Ellail M. 2011. Roles des protéines de type nucléoline (AtNUC-L1 et AtNUC-L2) dans la transcription des gènes ADNr, dans la floraison et la réponse au stress chez *Arabidopsis thaliana*. *Thèse de Doctorat Université de Perpignan Via Domitia*: 180.
- Abou-Ellail M, Cooke R, Saez-Vasquez J. 2011. Variations in a team: major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**: 294-299.
- Albert AC, Denton M, Kermekchiev M, Pikaard CS. 1999. Histone acetyltransferase and protein kinase activities copurify with a putative *Xenopus* RNA polymerase I holoenzyme self-sufficient for promoter-dependent transcription. *Molecular and cellular biology* **19**: 796-806.
- Allinne J, Pichugin A, Iarovaia O, Klibi M, Barat A, Zlotek-Zlotkiewicz E, Markozashvili D, Petrova N, Camara-Clayette V, Ioudinkova E et al. 2014. Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood* **123**: 2044-2053.
- Alvarez M, Molina A, Quezada C, Pinto R, Krauskopf M, Vera MI. 2004. Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *Journal of thermal biology* **29**: 663-667
- Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**: 77-83.
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S et al. 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *The EMBO journal* **25**: 1669-1679.
- Audas TE, Jacob MD, Lee S. 2012a. Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Molecular cell* **45**: 147-157.
- . 2012b. The nucleolar detention pathway: A cellular strategy for regulating molecular networks. *Cell Cycle* **11**: 2059-2062.
- Balinsky CA, Schmeisser H, Ganesan S, Singh K, Pierson TC, Zoon KC. 2013. Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles. *Journal of virology* **87**: 13094-13106.
- Barah P, Jayavelu ND, Mundy J, Bones AM. 2013a. Genome scale transcriptional response diversity among ten ecotypes of *Arabidopsis thaliana* during heat stress. *Frontiers in plant science* **4**: 532.
- Barah P, Jayavelu ND, Rasmussen S, Nielsen HB, Mundy J, Bones AM. 2013b. Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *BMC genomics* **14**: 722.
- Barakat A, Szick-Miranda K, Chang IF, Guyot R, Blanc G, Cooke R, Delseny M, Bailey-Serres J. 2001. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant physiology* **127**: 398-415.
- Barel M, Meibom K, Charbit A. 2010. Nucleolin, a shuttle protein promoting infection of human monocytes by *Francisella tularensis*. *PloS one* **5**: e14193.
- Barneche F, Steinmetz F, Echeverria M. 2000. Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **275**: 27212-27220.
- Bassy O, Jimenez-Garcia LF, Echeverria OM, Vazquez-Nin GH, Diaz de la Espina SM. 2000. High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by in situ



- hybridization. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **92**: 59-70.
- Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M, Moss T. 1994. Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**: 1134-1137.
- Beerens N, Hoeijmakers JH, Kanaar R, Vermeulen W, Wyman C. 2005. The CSB protein actively wraps DNA. *The Journal of biological chemistry* **280**: 4722-4729.
- Belenguer P, Baldin V, Mathieu C, Prats H, Bensaid M, Bouche G, Amalric F. 1989. Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic acids research* **17**: 6625-6636.
- Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**: 1090-1093.
- Belotserkovskaya R, Saunders A, Lis JT, Reinberg D. 2004. Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. *Biochimica et biophysica acta* **1677**: 87-99.
- Bertrand E, Houser-Scott F, Kendall A, Singer RH, Engelke DR. 1998. Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes & development* **12**: 2463-2468.
- Beven AF, Lee R, Razaz M, Leader DJ, Brown JW, Shaw PJ. 1996. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *Journal of cell science* **109 (Pt 6)**: 1241-1251.
- Bharti AK, Olson MO, Kufe DW, Rubin EH. 1996. Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1993-1997.
- Bhatt P, d'Avout C, Kane NS, Borowiec JA, Saxena A. 2012. Specific domains of nucleolin interact with Hdm2 and antagonize Hdm2-mediated p53 ubiquitination. *The FEBS journal* **279**: 370-383.
- Biedermann S, Hellmann H. 2010. The DDB1a interacting proteins ATCSA-1 and DDB2 are critical factors for UV-B tolerance and genomic integrity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **62**: 404-415.
- Bird AP, Taggart MH, Gehring CA. 1981. Methylated and unmethylated ribosomal RNA genes in the mouse. *Journal of molecular biology* **152**: 1-17.
- Blackler AW, Gecking CA. 1972. Transmission of sex cells of one species through the body of a second species in the genus *Xenopus*. II. Interspecific matings. *Developmental biology* **27**: 385-394.
- Blevins T, Pontvianne F, Cocklin R, Podicheti R, Chandrasekhara C, Yerneni S, Braun C, Lee B, Rusch D, Mockaitis K et al. 2014. A two-step process for epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Molecular cell* **54**: 30-42.
- Bogre L, Jonak C, Mink M, Meskiene I, Traas J, Ha DT, Swoboda I, Plank C, Wagner E, Heberle-Bors E et al. 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMs1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *The Plant cell* **8**: 417-428.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 574-585.
- Borisjuk NV, Davidjuk YM, Kostishin SS, Miroshnichenco GP, Velasco R, Hemleben V, Volkov RA. 1997. Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana*. *Plant molecular biology* **35**: 655-660.
- Bose S, Basu M, Banerjee AK. 2004. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *Journal of virology* **78**: 8146-8158.
- Bouche G, Caizergues-Ferrer M, Bugler B, Amalric F. 1984. Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic acids research* **12**: 3025-3035.
- Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F. 1987. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0----G1 transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6770-6774.
- Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Molecular cell* **40**: 216-227.
- Bourbon H, Bugler B, Caizergues-Ferrer M, Amalric F. 1983. Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein. *FEBS letters* **155**: 218-222.

- Bourbon HM, Lapeyre B, Amalric F. 1988. Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *Journal of molecular biology* **200**: 627-638.
- Bourbousse C, Ahmed I, Roudier F, Zabulon G, Blondet E, Balzergue S, Colot V, Bowler C, Barneche F. 2012. Histone H2B monoubiquitination facilitates the rapid modulation of gene expression during Arabidopsis photomorphogenesis. *PLoS genetics* **8**: e1002825.
- Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F. 1998. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *The Journal of biological chemistry* **273**: 19025-19029.
- Brown DD, Gurdon JB. 1964. Absence of Ribosomal Rna Synthesis in the Anucleolate Mutant of *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**: 139-146.
- Brown JW, Shaw PJ. 2008. The role of the plant nucleolus in pre-mRNA processing. *Current topics in microbiology and immunology* **326**: 291-311.
- Brzeski J, Jerzmanowski A. 2003. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *The Journal of biological chemistry* **278**: 823-828.
- Bugler B, Caizergues-Ferrer M, Bouche G, Bourbon H, Amalric F. 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *European journal of biochemistry / FEBS* **128**: 475-480.
- Buzas DM, Tamada Y, Kurata T. 2012. FLC: a hidden polycomb response element shows up in silence. *Plant & cell physiology* **53**: 785-793.
- Calle A, Ugrinova I, Epstein AL, Bouvet P, Diaz JJ, Greco A. 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of virology* **82**: 4762-4773.
- 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.
- Carpentier M, Morelle W, Coddeville B, Pons A, Masson M, Mazurier J, Legrand D. 2005. Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* **44**: 5804-5815.
- Caspersson T, Schultz J. 1940. Ribonucleic Acids in Both Nucleus and Cytoplasm, and the Function of the Nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **26**: 507-515.
- Cassidy DM, Blackler AW. 1974. Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Developmental biology* **41**: 84-96.
- Cavrak VV, Lettner N, Jamge S, Kosarewicz A, Bayer LM, Mittelsten Scheid O. 2014. How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. *PLoS genetics* **10**: e1004115.
- Chakravarthy S, Park YJ, Chodaparambil J, Edayathumangalam RS, Luger K. 2005. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS letters* **579**: 895-898.
- Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature reviews Genetics* **6**: 351-360.
- Chang IF, Szick-Miranda K, Pan S, Bailey-Serres J. 2005. Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant physiology* **137**: 848-862.
- Charon C, Bruggeman Q, Thareau V, Henry Y. 2012. Gene duplication within the Green Lineage: the case of TEL genes. *Journal of experimental botany* **63**: 5061-5077.
- Chathoth KT, Ganesan G, Rao MR. 2009. Identification of a novel nucleolin related protein (NRP) gene expressed during rat spermatogenesis. *BMC molecular biology* **10**: 64.
- Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M, Karin M. 2000. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes & development* **14**: 1236-1248.
- Chen D, Huang S. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *The Journal of cell biology* **153**: 169-176.

- Chen D, Texada DE. 2006. Low-usage codons and rare codons of *Escherichia*. *Gene Therapy and Molecular Biology* **10**: 1-12.
- Chen J, Guo K, Kastan MB. 2012. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *The Journal of biological chemistry* **287**: 16467-16476.
- Chen S, Seiler J, Santiago-Reichel M, Felbel K, Grummt I, Voit R. 2013. Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Molecular cell* **52**: 303-313.
- Chen T, Li E. 2004. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current topics in developmental biology* **60**: 55-89.
- Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. 1998. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in Arabidopsis allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14891-14896.
- Chen ZJ, Pikaard CS. 1997a. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & development* **11**: 2124-2136.
- . 1997b. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in Brassica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3442-3447.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**: 834-840.
- Clapier CR, Cairns BR. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* **78**: 273-304.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**: 735-743.
- Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A. 2008. Nucleolus: the ribosome factory. *Histology and histopathology* **23**: 1291-1298.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R, Fakan S. 2000. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochemistry and cell biology* **113**: 181-187.
- Comella P, Pontvianne F, Lahmy S, Vignols F, Barbezier N, Debures A, Jobet E, Brugidou E, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2008. Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. *Nucleic acids research* **36**: 1163-1175.
- Conconi A, Widmer RM, Koller T, Sogo JM. 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**: 753-761.
- Condon C, Liveris D, Squires C, Schwartz I, Squires CL. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of bacteriology* **177**: 4152-4156.
- Cong R, Das S, Douet J, Wong J, Buschbeck M, Mongelard F, Bouvet P. 2014. macroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic acids research* **42**: 181-192.
- Cong R, Das S, Ugrinova I, Kumar S, Mongelard F, Wong J, Bouvet P. 2012. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic acids research* **40**: 9441-9454.
- Copenhaver GP, Putnam CD, Denton ML, Pikaard CS. 1994. The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic acids research* **22**: 2651-2657.
- Cordesse F, Cooke R, Tremousaygue D, Grellet F, Delseny M. 1993. Fine structure and evolution of the rDNA intergenic spacer in rice and other cereals. *Journal of molecular evolution* **36**: 369-379.

- Daniely Y, Borowiec JA. 2000. Formation of a complex between nucleolin and replication protein A after cell stress prevents initiation of DNA replication. *The Journal of cell biology* **149**: 799-810.
- Daniely Y, Dimitrova DD, Borowiec JA. 2002. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Molecular and cellular biology* **22**: 6014-6022.
- Das S, Cong R, Shandilya J, Senapati P, Moindrot B, Monier K, Delage H, Mongelard F, Kumar S, Kundu TK et al. 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS letters* **587**: 417-424.
- David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J. 2003. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular biology and evolution* **20**: 1425-1434.
- De A, Donahue SL, Tabah A, Castro NE, Mraz N, Cruise JL, Campbell C. 2006. A novel interaction [corrected] of nucleolin with Rad51. *Biochemical and biophysical research communications* **344**: 206-213.
- de Carcer G, Cerdido A, Medina FJ. 1997. NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta* **201**: 487-495.
- de Carcer G, Medina FJ. 1999. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *Journal of structural biology* **128**: 139-151.
- Dean P, Kenny B. 2011. Cell-surface nucleolin is sequestered into EPEC microcolonies and may play a role during infection. *Microbiology* **157**: 1761-1767.
- DeBolt S. 2010. Copy number variation shapes genome diversity in Arabidopsis over immediate family generational scales. *Genome biology and evolution* **2**: 441-453.
- Delcasso-Tremousaygue D, Grellet F, Panabieres F, Ananiev ED, Delseny M. 1988. Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant. *European journal of biochemistry / FEBS* **172**: 767-776.
- Delseny M, Aspart L, Cooke R, Grellet F, Penon P. 1979. Restriction analysis of radish nuclear genes coding for rRNA: evidence for heterogeneity. *Biochemical and biophysical research communications* **91**: 540-547.
- Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. 2000. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of pathology* **191**: 181-186.
- Doelling JH, Gaudino RJ, Pikaard CS. 1993. Functional analysis of Arabidopsis thaliana rRNA gene and spacer promoters in vivo and by transient expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7528-7532.
- Doelling JH, Pikaard CS. 1995. The minimal ribosomal RNA gene promoter of Arabidopsis thaliana includes a critical element at the transcription initiation site. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **8**: 683-692.
- Dover GA, Flavell RB. 1984. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. *Cell* **38**: 622-623.
- Doyen CM, An W, Angelov D, Bondarenko V, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S. 2006. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Molecular and cellular biology* **26**: 1156-1164.
- Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y et al. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**: 967-970.
- Drouin G, de Sa MM. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular biology and evolution* **12**: 481-493.
- Du J, Johnson LM, Groth M, Feng S, Hale CJ, Li S, Vashisht AA, Gallego-Bartolome J, Wohlschlegel JA, Patel DJ et al. 2014. Mechanism of DNA Methylation-Directed Histone Methylation by KRYPTONITE. *Molecular cell* **55**: 495-504.

- Du J, Zhong X, Bernatavichute YV, Stroud H, Feng S, Caro E, Vashisht AA, Terragni J, Chin HG, Tu A et al. 2012. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* **151**: 167-180.
- Dundr M, Hoffmann-Rohrer U, Hu Q, Grummt I, Rothblum LI, Phair RD, Misteli T. 2002. A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* **298**: 1623-1626.
- Dundr M, Misteli T, Olson MO. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The Journal of cell biology* **150**: 433-446.
- Dundr M, Olson MO. 1998. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Molecular biology of the cell* **9**: 2407-2422.
- Durut N, Abou-Ellail M, Pontvianne F, Das S, Kojima H, Ukai S, de Bures A, Comella P, Nidelet S, Rialle S et al. 2014. A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in Arabidopsis. *The Plant cell*.
- Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS. 2006. Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes & development* **20**: 1283-1293.
- Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes & development* **24**: 1119-1132.
- Edwards TK, Saleem A, Shaman JA, Dennis T, Gerigk C, Oliveros E, Gartenberg MR, Rubin EH. 2000. Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* **275**: 36181-36188.
- Egyhazi E, Pigon A, Chang JH, Ghaffari SH, Dreesen TD, Wellman SE, Case ST, Olson MO. 1988. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in Chironomus salivary gland cells. *Experimental cell research* **178**: 264-272.
- Eitoku M, Sato L, Senda T, Horikoshi M. 2008. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 414-444.
- Endo M, Ishikawa Y, Osakabe K, Nakayama S, Kaya H, Araki T, Shibahara K, Abe K, Ichikawa H, Valentine L et al. 2006. Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants. *The EMBO journal* **25**: 5579-5590.
- Erard MS, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A, Amalric F. 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *European journal of biochemistry / FEBS* **175**: 525-530.
- Escande ML, Gas N, Stevens BJ. 1985. Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **53**: 99-109.
- Finger LD, Johansson C, Rinaldi B, Bouvet P, Feigon J. 2004. Contributions of the RNA-binding and linker domains and RNA structure to the specificity and affinity of the nucleolin RBD12/NRE interaction. *Biochemistry* **43**: 6937-6947.
- Flavell RB, O'Dell M, Thompson WF. 1988. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. *Journal of molecular biology* **204**: 523-534.
- Fontana F. 1781. Traité sur le venin de la vipère [...] avec des observations sur la structure primitive du corps animal [...]. (Florence).
- Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH. 2006. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell* **23**: 471-482.
- Franklin KA. 2010. Plant chromatin feels the heat. *Cell* **140**: 26-28.
- Franz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. 2002. Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14584-14589.

- French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M, Beyer AL. 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. *Molecular and cellular biology* **23**: 1558-1568.
- Freud S. 1881. Über den Bau der Nervenfasern und Nervenzellen beim Flusskrebs. *Austrian Academy of Science*: 12-15.
- Frieman M, Chen ZJ, Saez-Vasquez J, Shen LA, Pikaard CS. 1999. RNA polymerase I transcription in a *Brassica* interspecific hybrid and its progenitors: Tests of transcription factor involvement in nucleolar dominance. *Genetics* **152**: 451-460.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R. 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* **110**: 339-348.
- Gao J, Zhu Y, Zhou W, Molinier J, Dong A, Shen WH. 2012. NAP1 family histone chaperones are required for somatic homologous recombination in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**: 1437-1447.
- Gas N, Escande ML, Stevens BJ. 1985. Immunolocalization of the 100 kDa nucleolar protein during the mitotic cycle in CHO cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **53**: 209-218.
- Gaudino RJ, Pikaard CS. 1997. Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **272**: 6799-6804.
- Gaume X, Monier K, Argoul F, Mongelard F, Bouvet P. 2011. In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP. *Biochemistry research international* **2011**: 187624.
- Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Puvion-Dutilleul F, Amalric F, Bouvet P. 1996. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *Journal of molecular biology* **260**: 34-53.
- Ghisolfi L, Kharrat A, Joseph G, Amalric F, Erard M. 1992. Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **209**: 541-548.
- Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *The EMBO journal* **17**: 1476-1486.
- Ginisty H, Serin G, Ghisolfi-Nieto L, Roger B, Libante V, Amalric F, Bouvet P. 2000. Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. *The Journal of biological chemistry* **275**: 18845-18850.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *Journal of cell science* **112 ( Pt 6)**: 761-772.
- Goldstein M, Derheimer FA, Tait-Mulder J, Kastan MB. 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 16874-16879.
- Gonzalez-Camacho F, Medina FJ. 2004. Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics* **4**: 407-417.
- Goodfellow SJ, Zomerdijk JC. 2013. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Sub-cellular biochemistry* **61**: 211-236.
- Grainger RM, Maizels N. 1980. Dictyostelium ribosomal RNA is processed during transcription. *Cell* **20**: 619-623.
- Greco A, Arata L, Soler E, Gaume X, Coute Y, Hacot S, Calle A, Monier K, Epstein AL, Sanchez JC et al. 2012. Nucleolin interacts with US11 protein of herpes simplex virus 1 and is involved in its trafficking. *Journal of virology* **86**: 1449-1457.
- Grinstein E, Du Y, Santourlidis S, Christ J, Uhrberg M, Wernet P. 2007a. Nucleolin regulates gene expression in CD34-positive hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* **282**: 12439-12449.
- Grinstein E, Santourlidis S, Fischer J, Uhrberg M, Wernet P. 2007b. Nucleolin activates expression of CD34 and Bcl-2 in CD34-positive hematopoietic cells. *Journal of stem cells & regenerative medicine* **2**: 18-19.

- Grob A, Collieran C, McStay B. 2014. Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes & development* **28**: 220-230.
- Gruendler P, Unfried I, Pascher K, Schweizer D. 1991. rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana*. Structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *Journal of molecular biology* **221**: 1209-1222.
- Grummt I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes & development* **17**: 1691-1702.
- . 2010. Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *The FEBS journal* **277**: 4626-4639.
- . 2013. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma* **122**: 487-497.
- Grummt I, Ladurner AG. 2008. A metabolic throttle regulates the epigenetic state of rDNA. *Cell* **133**: 577-580.
- Grummt I, Pikaard CS. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 641-649.
- Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W et al. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**: 948-951.
- Guerrero PA, Maggert KA. 2011. The CCCTC-binding factor (CTCF) of *Drosophila* contributes to the regulation of the ribosomal DNA and nucleolar stability. *PloS one* **6**: e16401.
- Gulli MP, Faubladiere M, Sicard H, Caizergues-Ferrer M. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of gar2, a fission yeast nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma* **105**: 532-541.
- Gulli MP, Girard JP, Zabetakis D, Lapeyre B, Melese T, Caizergues-Ferrer M. 1995. gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation. *Nucleic acids research* **23**: 1912-1918.
- Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ, Maizels N. 1997. Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3605-3610.
- Hanakahi LA, Sun H, Maizels N. 1999. High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *The Journal of biological chemistry* **274**: 15908-15912.
- Hannan KM, Hannan RD, Smith SD, Jefferson LS, Lun M, Rothblum LI. 2000. Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* **19**: 4988-4999.
- Hannan RD, Cavanaugh A, Hempel WM, Moss T, Rothblum L. 1999. Identification of a mammalian RNA polymerase I holoenzyme containing components of the DNA repair/replication system. *Nucleic acids research* **27**: 3720-3727.
- Harper F, Puvion-Dutilleul F. 1979. Non-nucleolar transcription complexes of rat liver as revealed by spreading isolated nuclei. *Journal of cell science* **40**: 181-192.
- Hartung F, Suer S, Puchta H. 2007. Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18836-18841.
- Heitz E. 1931. Nukleolen und chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta medica* **15**: 495-505.
- Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I. 1998. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* **17**: 7373-7381.
- Heix J, Zomerdiik JC, Ravanpay A, Tjian R, Grummt I. 1997. Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1733-1738.

- Heo K, Kim B, Kim K, Choi J, Kim H, Zhan Y, Ranish JA, An W. 2007. Isolation and characterization of proteins associated with histone H3 tails in vivo. *The Journal of biological chemistry* **282**: 15476-15483.
- Hernandez-Verdun D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and cell biology* **125**: 127-137.
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J. 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *Journal of cell science* **115**: 2265-2270.
- Hiscox JA. 2002. The nucleolus--a gateway to viral infection? *Archives of virology* **147**: 1077-1089.
- Honjo T, Reeder RH. 1973. Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*. *Journal of molecular biology* **80**: 217-228.
- Horiguchi G, Molla-Morales A, Perez-Perez JM, Kojima K, Robles P, Ponce MR, Micol JL, Tsukaya H. 2011. Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **65**: 724-736.
- Horiguchi G, Van Lijsebettens M, Candela H, Micol JL, Tsukaya H. 2012. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **191-192**: 24-34.
- Houchins K, O'Dell M, Flavell RB, Gustafson JP. 1997. Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids. *Molecular & general genetics : MGG* **255**: 294-301.
- Hozak P, Novak JT, Smetana K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **66**: 225-233.
- Hsieh TF, Fischer RL. 2005. Biology of chromatin dynamics. *Annual review of plant biology* **56**: 327-351.
- Huddleson JP, Ahmad N, Lingrel JB. 2006. Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires nucleolin. *The Journal of biological chemistry* **281**: 15121-15128.
- Ide S, Miyazaki T, Maki H, Kobayashi T. 2010. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**: 693-696.
- Ihara M, Tseng H, Schultz RM. 2011. Expression of variant ribosomal RNA genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biology of reproduction* **84**: 944-946.
- Indig FE, Rybanska I, Karmakar P, Devulapalli C, Fu H, Carrier F, Bohr VA. 2012. Nucleolin inhibits G4 oligonucleotide unwinding by Werner helicase. *PLoS one* **7**: e35229.
- Ito T, Kim GT, Shinozaki K. 2000. Disruption of an *Arabidopsis* cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **22**: 257-264.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560.
- Jacob MD, Audas TE, Uniacke J, Trinkle-Mulcahy L, Lee S. 2013. Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. *Molecular biology of the cell* **24**: 2943-2953.
- Jacobson MR, Pederson T. 1998. Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7981-7986.
- Jady BE, Bertrand E, Kiss T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *The Journal of cell biology* **164**: 647-652.
- Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ. 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature genetics* **22**: 94-97.
- Jiang B, Zhang B, Liang P, Song J, Deng H, Tu Z, Deng G, Xiao X. 2010a. Nucleolin/C23 mediates the antiapoptotic effect of heat shock protein 70 during oxidative stress. *The FEBS journal* **277**: 642-652.



- Jiang WK, Liu YL, Xia EH, Gao LZ. 2013. Prevalent role of gene features in determining evolutionary fates of whole-genome duplication duplicated genes in flowering plants. *Plant physiology* **161**: 1844-1861.
- Jiang Y, Li Z, Nagy PD. 2010b. Nucleolin/Nsr1p binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology* **396**: 10-20.
- Johnson FB, Marciniak RA, Guarente L. 1998. Telomeres, the nucleolus and aging. *Current opinion in cell biology* **10**: 332-338.
- Jordan EG. 1984. Nucleolar nomenclature. *Journal of cell science* **67**: 217-220.
- Journey LJ, Goldstein MN. 1961. Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D. *Cancer research* **21**: 929-932.
- Junera HR, Masson C, Geraud G, Hernandez-Verdun D. 1995. The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *Journal of cell science* **108 ( Pt 11)**: 3427-3441.
- Kato A, Nakajima T, Yamashita J, Yakura K, Tanifuji S. 1990. The structure of the large spacer region of the rDNA in *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Plant molecular biology* **14**: 983-993.
- Kermekchiev M, Workman JL, Pikaard CS. 1997. Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Molecular and cellular biology* **17**: 5833-5842.
- Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. 2004. Nucleolin interacts with telomerase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 51508-51515.
- Kim K, Dimitrova DD, Carta KM, Saxena A, Daras M, Borowiec JA. 2005. Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation. *Molecular and cellular biology* **25**: 2463-2474.
- Kim YK, Kim S, Shin YJ, Hur YS, Kim WY, Lee MS, Cheon CI, Verma DP. 2014. Ribosomal protein S6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* **289**: 3901-3912.
- Kirik A, Pecinka A, Wendeler E, Reiss B. 2006. The chromatin assembly factor subunit FASCIATA1 is involved in homologous recombination in plants. *The Plant cell* **18**: 2431-2442.
- Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. 2012. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PloS one* **7**: e49245.
- Kobayashi T. 2003. The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Molecular and cellular biology* **23**: 9178-9188.
- Kobayashi T, Ganley AR. 2005. Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* **309**: 1581-1584.
- Kobayashi T, Heck DJ, Nomura M, Horiuchi T. 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes & development* **12**: 3821-3830.
- Koberna K, Malinsky J, Pliss A, Masata M, Vecerova J, Fialova M, Bednar J, Raska I. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *The Journal of cell biology* **157**: 743-748.
- Kobor MS, Lorincz MC. 2009. H2A.Z and DNA methylation: irreconcilable differences. *Trends in biochemical sciences* **34**: 158-161.
- Koch S, Garcia Gonzalez O, Assfalg R, Schelling A, Schafer P, Scharffetter-Kochanek K, Iben S. 2014. Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. *Cell Cycle* **13**: 2029-2037.
- Kojima H, Suzuki T, Kato T, Enomoto K, Sato S, Tabata S, Saez-Vasquez J, Echeverria M, Nakagawa T, Ishiguro S et al. 2007. Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **49**: 1053-1063.

- Kondo K, Inouye M. 1992. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *The Journal of biological chemistry* **267**: 16252-16258.
- Kondo K, Kowalski LR, Inouye M. 1992. Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *The Journal of biological chemistry* **267**: 16259-16265.
- Koroleva OA, Calder G, Pendle AF, Kim SH, Lewandowska D, Simpson CG, Jones IM, Brown JW, Shaw PJ. 2009. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *The Plant cell* **21**: 1592-1606.
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology* **10**: 310-316.
- Koutsoumpa M, Papadimitriou E. 2014. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **9**: 137-152.
- Kruger T, Zentgraf H, Scheer U. 2007. Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins. *The Journal of cell biology* **177**: 573-578.
- Kuhn A, Vente A, Doree M, Grummt I. 1998. Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *Journal of molecular biology* **284**: 1-5.
- Kumar SV, Wigge PA. 2010. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell* **140**: 136-147.
- Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. 1993. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**: 585-596.
- Lachner M, Jenuwein T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current opinion in cell biology* **14**: 286-298.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- Laine JP, Egly JM. 2006. When transcription and repair meet: a complex system. *Trends in genetics : TIG* **22**: 430-436.
- Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. 2007. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Current biology : CB* **17**: 749-760.
- Lange H, Sement FM, Gagliardi D. 2011. MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **68**: 51-63.
- Langst G, Blank TA, Becker PB, Grummt I. 1997. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *The EMBO journal* **16**: 760-768.
- Lapeyre B, Amalric F, Ghaffari SH, Rao SV, Dumber TS, Olson MO. 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *The Journal of biological chemistry* **261**: 9167-9173.
- Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F. 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 1472-1476.
- Lapeyre B, Caizergues-Ferrer M, Bouche G, Amalric F. 1985. Cloning of cDNA encoding a 100 kDa nucleolar protein (nucleoline) of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic acids research* **13**: 5805-5816.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant physiology* **138**: 882-897.
- Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews Genetics* **11**: 204-220.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS. 2004. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molecular cell* **13**: 599-609.

- Learned RM, Learned TK, Haltiner MM, Tjian RT. 1986. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* **45**: 847-857.
- Lee J, Hwang YJ, Ryu H, Kowall NW. 2014. Nucleolar dysfunction in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1842**: 785-790.
- Lee WC, Zabetakis D, Melese T. 1992. NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Molecular and cellular biology* **12**: 3865-3871.
- Leger-Silvestre I, Trumtel S, Noaillac-Depeyre J, Gas N. 1999. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* **108**: 103-113.
- Leitinger N, Wesierska-Gadek J. 1993. ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells. *Journal of cellular biochemistry* **52**: 153-158.
- Leung AK, Lamond AI. 2003. The dynamics of the nucleolus. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **13**: 39-54.
- Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE. 2006a. An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **126**: 93-106.
- Li H, Tsang CK, Watkins M, Bertram PG, Zheng XF. 2006b. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* **442**: 1058-1061.
- Li J, Langst G, Grummt I. 2006c. NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *The EMBO journal* **25**: 5735-5741.
- Li W, Yang X, Lin Z, Timofejeva L, Xiao R, Makaroff CA, Ma H. 2005. The ATRAD51C gene is required for normal meiotic chromosome synapsis and double-stranded break repair in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **138**: 965-976.
- Liu J, Du X, Ke Y. 2006a. Mapping nucleolar localization sequences of 1A6/DRIM. *FEBS letters* **580**: 1405-1410.
- Liu X, Yu CW, Duan J, Luo M, Wang K, Tian G, Cui Y, Wu K. 2012. HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **158**: 119-129.
- Liu Y, Taylor MW, Edenberg HJ. 2006b. Model-based identification of cis-acting elements from microarray data. *Genomics* **88**: 452-461.
- Lo KY, Li Z, Bussiere C, Bresson S, Marcotte EM, Johnson AW. 2010. Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Molecular cell* **39**: 196-208.
- Lohrum MA, Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH. 2000. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nature cell biology* **2**: 179-181.
- Losfeld ME, Khoury DE, Mariot P, Carpentier M, Krust B, Briand JP, Mazurier J, Hovanessian AG, Legrand D. 2009. The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells. *Experimental cell research* **315**: 357-369.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. 1997. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of molecular biology* **272**: 301-311.
- Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R. 2013. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of genetics* **92**: 155-161.
- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DP. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant cell* **18**: 477-490.
- March-Diaz R, Garcia-Dominguez M, Lozano-Juste J, Leon J, Florencio FJ, Reyes JC. 2008. Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **53**: 475-487.
- March-Diaz R, Reyes JC. 2009. The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. *Molecular plant* **2**: 565-577.

- Marciniak RA, Lombard DB, Johnson FB, Guarente L. 1998. Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6887-6892.
- Maridor G, Nigg EA. 1990. cDNA sequences of chicken nucleolin/C23 and NO38/B23, two major nucleolar proteins. *Nucleic acids research* **18**: 1286.
- Martin M, Garcia-Fernandez LF, Diaz de la Espina SM, Noaillac-Depeyre J, Gas N, Javier Medina F. 1992. Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp Cell Res* **199**: 74-84.
- Masiuk M. 2010. Nucleolin-Characteristics of Protein and its Role in Biology of Cancer and Viral Infections. *Advances in Cell Biology* **1**: 1-19.
- Mayer C, Bierhoff H, Grummt I. 2006a. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes & development* **19**: 933-941.
- Mayer C, Neubert M, Grummt I. 2008. The structure of NoRC-associated RNA is crucial for targeting the chromatin remodelling complex NoRC to the nucleolus. *EMBO reports* **9**: 774-780.
- Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R. 2006b. Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Molecular cell* **22**: 351-361.
- McClintock B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea Mays. *Zeit Zelforsch Mik Anat* **21**: 294-328.
- McStay B, Grummt I. 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annual review of cell and developmental biology* **24**: 131-157.
- Medina FJ, Cerdido A, de Carcer G. 2000. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *European journal of histochemistry : EJH* **44**: 117-131.
- Medina FJ, Cerdido A, Fernandez-Gomez ME. 1995. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Experimental cell research* **221**: 111-125.
- Mekhail K, Rivero-Lopez L, Al-Masri A, Brandon C, Khacho M, Lee S. 2007. Identification of a common subnuclear localization signal. *Molecular biology of the cell* **18**: 3966-3977.
- Melese T, Xue Z. 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current opinion in cell biology* **7**: 319-324.
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 6422-6427.
- Mentewab AB, Jacobsen MJ, Flowers RA. 2011. Incomplete homogenization of 18 S ribosomal DNA coding regions in Arabidopsis thaliana. *BMC research notes* **4**: 93.
- Messmer B, Dreyer C. 1993. Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of Xenopus laevis. *European journal of cell biology* **61**: 369-382.
- Miller G, Panov KI, Friedrich JK, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Zomerdijk JC. 2001. hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *The EMBO journal* **20**: 1373-1382.
- Miller OL, Jr., Beatty BR. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**: 955-957.
- Minsky N, Shema E, Field Y, Schuster M, Segal E, Oren M. 2008. Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nature cell biology* **10**: 483-488.
- Misteli T. 2001. The concept of self-organization in cellular architecture. *The Journal of cell biology* **155**: 181-185.
- Mongelard F, Bouvet P. 2007. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology* **17**: 80-86.
- Morena-Dias de la Espina S, Medina FJ, Risueno MC. 1980. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *European journal of cell biology* **22**: 724-729.
- Mosgoeller W. 2004. Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In *The Nucleus, Olson, MOJ Landes Biosciences, George-town*: 10-20.

- Moss T. 2004. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Current opinion in genetics & development* **14**: 210-217.
- Mougey EB, O'Reilly M, Osheim Y, Miller OL, Jr., Beyer A, Sollner-Webb B. 1993. The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes & development* **7**: 1609-1619.
- Mozgova I, Mokros P, Fajkus J. 2010. Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **22**: 2768-2780.
- Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K et al. 2008. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**: 627-639.
- Muro E, Gebrane-Younis J, Jobart-Malfait A, Louvet E, Roussel P, Hernandez-Verdun D. 2010. The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus* **1**: 202-211.
- Navashin M. 1934. Chromosomal alterations caused by hybridization and their bearing upon certain general genetic problems. *Cytologia* **5**.
- Nemeth A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, Peterfia B, Solovei I, Cremer T, Dopazo J, Langst G. 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS genetics* **6**: e1000889.
- Nemeth A, Guibert S, Tiwari VK, Ohlsson R, Langst G. 2008. Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *The EMBO journal* **27**: 1255-1265.
- Nemeth A, Langst G. 2011. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends in genetics : TIG* **27**: 149-156.
- Neves N, Heslop-Harrison JS, Viegas W. 1995. rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo development in wheat x rye hybrids. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* **91**: 529-533.
- Nordin K, Vahala T, Palva ET. 1993. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant molecular biology* **21**: 641-653.
- O'Sullivan JM, Sontam DM, Grierson R, Jones B. 2009. Repeated elements coordinate the spatial organization of the yeast genome. *Yeast* **26**: 125-138.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS letters* **506**: 272-276.
- Olson MO, Dundr M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and cell biology* **123**: 203-216.
- Olson MO, Thompson BA. 1983. Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* **22**: 3187-3193.
- Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D. 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**: 284-288.
- Orrick LR, Olson MO, Busch H. 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 1316-1320.
- Paredes S, Maggert KA. 2009. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17829-17834.
- Parlato R, Liss B. 2014. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochimica et biophysica acta* **1842**: 791-797.
- Paule MR, White RJ. 2000. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic acids research* **28**: 1283-1298.
- Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Mittelsten Scheid O. 2010. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **22**: 3118-3129.
- Pederson T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.

- Pederson T, Politz JC. 2000. The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *The Journal of cell biology* **148**: 1091-1095.
- Pendle AF, Clark GP, Boon R, Lewandowska D, Lam YW, Andersen J, Mann M, Lamond AI, Brown JW, Shaw PJ. 2005. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Molecular biology of the cell* **16**: 260-269.
- Perry RP. 1962. The Cellular Sites of Synthesis of Ribosomal and 4s Rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**: 2179-2186.
- Perry RP, Errera M. 1961. The role of the nucleolus in ribonucleic acid-and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta* **49**: 47-57.
- Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA. 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**: 791-801.
- Petricka JJ, Nelson TM. 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant physiology* **144**: 173-186.
- Phair RD, Misteli T. 2001. Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 898-907.
- Philpott A, Krude T, Laskey RA. 2000. Nuclear chaperones. *Seminars in cell & developmental biology* **11**: 7-14.
- Pien S, Grossniklaus U. 2007. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochimica et biophysica acta* **1769**: 375-382.
- Pikaard CS. 1994. Ribosomal gene promoter domains can function as artificial enhancers of RNA polymerase I transcription, supporting a promoter origin for natural enhancers in Xenopus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 464-468.
- . 2000. The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends in genetics : TIG* **16**: 495-500.
- . 2002. Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **1**: e0083.
- Politz JC, Lewandowski LB, Pederson T. 2002. Signal recognition particle RNA localization within the nucleolus differs from the classical sites of ribosome synthesis. *The Journal of cell biology* **159**: 411-418.
- Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C, Pederson T. 2000. Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 55-60.
- Pollice A, Zibella MP, Billaud T, Laroche T, Pulitzer JF, Gilson E. 2000. In vitro binding of nucleolin to double-stranded telomeric DNA. *Biochemical and biophysical research communications* **268**: 909-915.
- Pontes O, Lawrence RJ, Silva M, Preuss S, Costa-Nunes P, Earley K, Neves N, Viegas W, Pikaard CS. 2007. Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar dominance. *PLoS one* **2**: e1157.
- Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen SE, Pikaard CS. 2006. The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* **126**: 79-92.
- Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ et al. 2010. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **6**: e1001225.
- Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD, Pikaard CS. 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes & development* **26**: 945-957.
- Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Mozgova I, Hassel C, Pontes OM, Tucker S, Mokros P, Muchova V, Fajkus J et al. 2013. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the

- nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes & development* **27**: 1545-1550.
- Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Molecular biology of the cell* **18**: 369-379.
- Postepska-Igielska A, Kronic D, Schmitt N, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Grummt I. 2013. The chromatin remodelling complex NoRC safeguards genome stability by heterochromatin formation at telomeres and centromeres. *EMBO reports* **14**: 704-710.
- Preti M, O'Donohue MF, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaille ML, Choemmel V, Gleizes PE. 2013. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic acids research* **41**: 4709-4723.
- Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrence RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JC, Baulcombe DC, Viegas W et al. 2008. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Molecular cell* **32**: 673-684.
- Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, Murfett J, Furner I et al. 2004. Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *The Plant cell* **16**: 1021-1034.
- Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Pichard E, Bachellerie JP, Puvion E. 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *European journal of cell biology* **58**: 149-162.
- Quezada C, Navarro C, San Martin R, Alvarez M, Molina A, Vera MI. 2006. Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: evidence for several genes. *Biological research* **39**: 353-365.
- Quin J, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. 2013. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochem Biophys Acta* **1842**: 802-816.
- Raman B, Guarnaccia C, Nadassy K, Zakhariev S, Pintar A, Zanuttin F, Frigyes D, Acatrinei C, Vindigni A, Pongor G et al. 2001. N(omega)-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids. *Nucleic acids research* **29**: 3377-3384.
- Raska I, Koberna K, Malinsky J, Fidlerova H, Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**: 579-594.
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006a. New insights into nucleolar architecture and activity. *International review of cytology* **255**: 177-235.
- . 2006b. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current opinion in cell biology* **18**: 325-334.
- Raue HA, Planta RJ. 1991. Ribosome biogenesis in yeast. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **41**: 89-129.
- Reeder RH. 1999. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **62**: 293-327.
- Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G, Datla R. 2011. Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant physiology* **155**: 1367-1382.
- Reynolds RC, Montgomery PO, Hughes B. 1964. Nucleolar "Caps" Produced by Actinomycin D. *Cancer research* **24**: 1269-1277.
- Rickards B, Flint SJ, Cole MD, LeRoy G. 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol* **27**: 937-948.
- Risueno MC, Medina FJ. 1986. The nucleolar structure in plant cells. *Revisiónes sobre biología celular : RBC* **7**: 1-154.

- Ritossa FM, Spiegelman S. 1965. Localization of DNA Complementary to Ribosomal Rna in the Nucleolus Organizer Region of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **53**: 737-745.
- Robertson KD. 2002. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379.
- Roger B, Moisan A, Amalric F, Bouvet P. 2002. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *The Journal of biological chemistry* **277**: 10209-10219.
- . 2003. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* **111**: 399-407.
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D. 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *The Journal of cell biology* **133**: 235-246.
- Russell J, Zomerdijk JC. 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in biochemical sciences* **30**: 87-96.
- Ryabov EV, Kim SH, Taliansky M. 2004. Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *The Journal of general virology* **85**: 1329-1333.
- Ryabov EV, Oparka KJ, Santa Cruz S, Robinson DJ, Taliansky ME. 1998. Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology* **242**: 303-313.
- Sadis S, Hickey E, Weber LA. 1988. Effect of heat shock on RNA metabolism in HeLa cells. *Journal of cellular physiology* **135**: 377-386.
- Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M. 2004a. Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochemical Society transactions* **32**: 578-580.
- . 2004b. A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Molecular and cellular biology* **24**: 7284-7297.
- Saez-Vasquez J, Echeverria M. 2006. Polymerase I transcription *In regulation of transcription in plants Grasser, KD, Oxford, UK: Blackbell*: 162-183.
- Saez-Vasquez J, Medina FJ. 2008. The plant Nucleus. *In botanical research: Incorporating Advances in Plant Pathology* **47**: 1-46.
- Saez-Vasquez J, Meissner M, Pikaard CS. 2001. RNA polymerase I holoenzyme-promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant molecular biology* **47**: 449-459.
- Saez-Vasquez J, Pikaard CS. 1997. Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11869-11874.
- . 2000. RNA polymerase I holoenzyme-promoter interactions. *The Journal of biological chemistry* **275**: 37173-37180.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18822-18827.
- Salvetti A, Greco A. 2014. Viruses and the nucleolus: The fatal attraction. *Biochimica et biophysica acta* **1842**: 840-847.
- Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, Robb E, Wong LH, Thomas WG, Stefanovsky V et al. 2008. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *The Journal of cell biology* **183**: 1259-1274.
- Santoro R, Grummt I. 2001. Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Molecular cell* **8**: 719-725.



- 2005. Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Molecular and cellular biology* **25**: 2539-2546.
- Santoro R, Li J, Grummt I. 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature genetics* **32**: 393-396.
- Santoro R, Schmitz KM, Sandoval J, Grummt I. 2010. Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans. *EMBO reports* **11**: 52-58.
- Sato S, Sato Y. 2010. Localization of rDNA at nucleolar structural components by immunoelectron microscopy. *Methods Mol Biol* **657**: 287-296.
- Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *The Journal of cell biology* **153**: 1097-1110.
- Saxena A, Rorie CJ, Dimitrova D, Daniely Y, Borowiec JA. 2006. Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene* **25**: 7274-7288.
- Scherl A, Coute Y, Deon C, Calle A, Kindbeiter K, Sanchez JC, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Molecular biology of the cell* **13**: 4100-4109.
- Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F et al. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615-623.
- Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, Grummt I. 2010. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes & development* **24**: 2264-2269.
- Schneeberger RG, Creissen GP, Cullis CA. 1989. Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene* **83**: 75-84.
- Schofer C, Weipoltshammer K, Almeder M, Muller M, Wachtler F. 1996. Redistribution of ribosomal DNA after blocking of transcription induced by actinomycin D. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **4**: 384-391.
- Schwab MS, Dreyer C. 1997. Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *European journal of cell biology* **73**: 287-297.
- Seither P, Iben S, Grummt I. 1998. Mammalian RNA polymerase I exists as a holoenzyme with associated basal transcription factors. *Journal of molecular biology* **275**: 43-53.
- Serin G, Joseph G, Faucher C, Ghisolfi L, Bouche G, Amalric F, Bouvet P. 1996. Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* **78**: 530-538.
- Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D. 2005. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Molecular biology of the cell* **16**: 2395-2413.
- Shaw PJ, Abranches R, Paula Santos A, Beven AF, Stoger E, Wegel E, Gonzalez-Melendi P. 2002. The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants. *Journal of structural biology* **140**: 31-38.
- Shaw PJ, Highett MI, Beven AF, Jordan EG. 1995. The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *The EMBO journal* **14**: 2896-2906.
- Shaw PJ, Jordan EG. 1995. The nucleolus. *Annual review of cell and developmental biology* **11**: 93-121.
- Shilatifard A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* **75**: 243-269.
- Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. 1992. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**: 457-470.
- Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Charbonneau H, Deshaies RJ. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**: 233-244.

- Simonet NG, Reyes M, Nardocci G, Molina A, Alvarez M. 2013. Epigenetic regulation of the ribosomal cistron seasonally modulates enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in response to different environmental inputs in carp (*Cyprinus carpio*). *Epigenetics & chromatin* **6**: 22.
- Sinclair DA, Mills K, Guarente L. 1997. Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* **277**: 1313-1316.
- Singh K, Laughlin J, Kosinski PA, Covey LR. 2004. Nucleolin is a second component of the CD154 mRNA stability complex that regulates mRNA turnover in activated T cells. *J Immunol* **173**: 976-985.
- Sipos K, Olson MO. 1991. Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochemical and biophysical research communications* **177**: 673-678.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. 1999. The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *Journal of cell science* **112 ( Pt 19)**: 3259-3268.
- . 2000. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology* **148**: 259-270.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and cell biology* **129**: 13-31.
- Sobol MA, Gonzales-Camacho F, Kordyum EL, Medina FJ. 2007. Nucleolar proteins change in altered gravity. *J Appl Biomed* **5**: 49-56.
- Sobol MA, Kordyum EL, Gonzalez-Camacho F, Rodriguez-Vilarino V, Medina FJ. 2004. Alterations of the intranucleolar DNA localization caused by simulated microgravity. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology* **11**: P189-190.
- Sogo JM, Thoma F. 2004. The structure of rDNA chromatin. In *The Nucleus, Olson, MOJ Landes Biosciences, George-town*: 73-87.
- Sorensen PD, Frederiksen S. 1991. Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic acids research* **19**: 4147-4151.
- Sripinyowanich S, Chamnanmanoontham N, Udomchalothorn T, Maneeprasopsuk S, Santawee P, Buaboocha T, Qu LJ, Gu H, Chadchawan S. 2013. Overexpression of a partial fragment of the salt-responsive gene OsNUC1 enhances salt adaptation in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.) during salt stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **213**: 67-78.
- Srivastava M, Fleming PJ, Pollard HB, Burns AL. 1989. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS letters* **250**: 99-105.
- Srivastava M, Pollard HB. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**: 1911-1922.
- Stark LA, Taliensky M. 2009. Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the Nucleolus and Disease. *EMBO reports* **10**: 35-40.
- Stefanovsky V, Moss T. 2006. Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count. *Cell Cycle* **5**: 735-739.
- Stepinski D. 2009. Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* **235**: 77-89.
- . 2012a. Immunofluorescent localization of ubiquitin and proteasomes in nucleolar vacuoles of soybean root meristematic cells. *European journal of histochemistry : EJH* **56**: e13.
- . 2012b. Levels of DNA methylation and histone methylation and acetylation change in root tip cells of soybean seedlings grown at different temperatures. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **61**: 9-17.
- . 2013. Nucleolar chromatin organization at different activities of soybean root meristematic cell nucleoli. *Protoplasma* **250**: 723-730.
- . 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma*.

- Storck S, Thiry M, Bouvet P. 2009. Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **101**: 153-167.
- Strang BL, Boulant S, Coen DM. 2010. Nucleolin associates with the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory subunit UL44 and is necessary for efficient viral replication. *Journal of virology* **84**: 1771-1784.
- Strang BL, Boulant S, Kirchhausen T, Coen DM. 2012. Host cell nucleolin is required to maintain the architecture of human cytomegalovirus replication compartments. *mBio* **3**.
- Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Langst G, Grummt I. 2001. NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal* **20**: 4892-4900.
- Suzuki N, Kobayashi M, Sakata K, Suzuki T, Hosoya T. 1991. Synergistic stimulatory effect of glucocorticoid, EGF and insulin on the synthesis of ribosomal RNA and phosphorylation of nucleolin in primary cultured rat hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta* **1092**: 367-375.
- Sylvester JE, Gonzales IL, Mougey EB. 2004. Structure and Organization of vertebrate ribosomal DNA. *In The Nucleus, Olson, MOJ Landes Biosciences, George-town*: 58-72.
- Szekely AM, Chen YH, Zhang C, Oshima J, Weissman SM. 2000. Werner protein recruits DNA polymerase delta to the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11365-11370.
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & integrative biology* **4**: 267-275.
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**: 49-63.
- Taliansky ME, Brown JW, Rajamaki ML, Valkonen JP, Kalinina NO. 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Advances in virus research* **77**: 119-158.
- Tamaru H, Selker EU. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283.
- Tariq M, Paszkowski J. 2004. DNA and histone methylation in plants. *Trends in genetics : TIG* **20**: 244-251.
- Taylor JS, Van de Peer Y, Braasch I, Meyer A. 2001. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **356**: 1661-1679.
- Teissere M, Penon P, van Huystee RB, Azou Y, Ricard J. 1975. Hormonal control of transcription in higher plants. *Biochimica et biophysica acta* **402**: 391-402.
- Tessarz P, Santos-Rosa H, Robson SC, Sylvestersen KB, Nelson CJ, Nielsen ML, Kouzarides T. 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* **505**: 564-568.
- Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D. 2000. Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* **6**: 1750-1761.
- Thiry M, Lafontaine DL. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in cell biology* **15**: 194-199.
- Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, Mathieu O, Paszkowski J, Vaillant I. 2010. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS genetics* **6**: e1001175.
- Tomas D, Brazao J, Viegas W, Silva M. 2013. Differential effects of high-temperature stress on nuclear topology and transcription of repetitive noncoding and coding rye sequences. *Cytogenetic and genome research* **139**: 119-127.
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. 2006. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Molecular biology of the cell* **17**: 955-965.
- Tong CG, Reichler S, Blumenthal S, Balk J, Hsieh HL, Roux SJ. 1997. Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. *Plant physiology* **114**: 643-652.

- Tremousaygue D, Garnier L, Bardet C, Dabos P, Herve C, Lescure B. 2003. Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in Arabidopsis thaliana cycling cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **33**: 957-966.
- Tremousaygue D, Laudie M, Grellet F, Delseny M. 1992. The Brassica oleracea rDNA spacer revisited. *Plant molecular biology* **18**: 1013-1018.
- Tsang CK, Liu H, Zheng XF. 2010. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle* **9**: 953-957.
- Tseng H, Chou W, Wang J, Zhang X, Zhang S, Schultz RM. 2008. Mouse ribosomal RNA genes contain multiple differentially regulated variants. *PLoS one* **3**: e1843.
- Tsou JH, Chang KY, Wang WC, Tseng JT, Su WC, Hung LY, Chang WC, Chen BK. 2008. Nucleolin regulates c-Jun/Sp1-dependent transcriptional activation of cPLA2alpha in phorbol ester-treated non-small cell lung cancer A549 cells. *Nucleic acids research* **36**: 217-227.
- Turck F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F. 1998. A heat-sensitive Arabidopsis thaliana kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Molecular and cellular biology* **18**: 2038-2044.
- Tuteja R, Tuteja N. 1998. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **33**: 407-436.
- Ueki M, Uchizawa E, Yakura K. 1992. The nucleotide sequence of the rDNA intergenic spacer region in a wild species of the genus Vicia, *V. angustifolia*. *Plant molecular biology* **18**: 175-178.
- Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, Thiry M, Storck S, Mongelard F, Bouvet P. 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC molecular biology* **8**: 66.
- Uno Y, Nishida C, Takagi C, Ueno N, Matsuda Y. 2013. Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. *Heredity* **111**: 430-436.
- Urawa H, Hidaka M, Ishiguro S, Okada K, Horiuchi T. 2001. Enhanced homologous recombination caused by the non-transcribed spacer of the rDNA in Arabidopsis. *Molecular genetics and genomics : MGG* **266**: 546-555.
- Valentin G. 1836. Repertorium für Anatomie und Physiologie. *Verlag von Veit und Comp*: 1-293.
- van de Nobelen S, Rosa-Garrido M, Leers J, Heath H, Souchit W, Joosen L, Jonkers I, Demmers J, van der Reijden M, Torrano V et al. 2010. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics & chromatin* **3**: 19.
- van Koningsbruggen S, Gierlinski M, Schofield P, Martin D, Barton GJ, Ariyurek Y, den Dunnen JT, Lamond AI. 2010. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Molecular biology of the cell* **21**: 3735-3748.
- Van Lijsebettens M, Vanderhaeghen R, De Block M, Bauw G, Villarroel R, Van Montagu M. 1994. An S18 ribosomal protein gene copy at the Arabidopsis PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. *The EMBO journal* **13**: 3378-3388.
- Viera A, Morais L, Barao A, Mello-Sampayo T, Viegas W. 1990. 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat x rye hybrids. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* **33**: 707-710.
- Villa-Hernandez JM, Dinkova TD, Aguilar-Caballero R, Rivera-Cabrera F, Sanchez de Jimenez E, Perez-Flores LJ. 2013. Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie* **95**: 1871-1879.
- Voit R, Schafer K, Grummt I. 1997. Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Molecular and cellular biology* **17**: 4230-4237.
- Volle C, Dalal Y. 2014. Histone variants: the tricksters of the chromatin world. *Current opinion in genetics & development* **25**: 8-14,138.
- von Kobbe C, Bohr VA. 2002. A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949-1092. *Journal of cell science* **115**: 3901-3907.
- Wachtler F, Ellinger A, Schwarzacher HG. 1980. Nucleolar changes in human phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Cell and tissue research* **213**: 351-360.

- Wachtler F, Roubicek C, Schedle A, Mosgoller W, Bretis G, Schwarzacher HG. 1990. Nucleolus organizer regions in human lymphocytes as studied with premature chromosome condensation. *Human genetics* **84**: 244-248.
- Wang K, Deng G, Chen G, Liu M, Yi Y, Yang T, McMillan DR, Xiao X. 2012. Heat shock protein 70 inhibits hydrogen peroxide-induced nucleolar fragmentation via suppressing cleavage and down-regulation of nucleolin. *Cell stress & chaperones* **17**: 121-130.
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K. 2009. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**: 1019-1031.
- Wanzenböck EM, Schofer C, Schweizer D, Bachmair A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **11**: 1007-1016.
- Warrener P, Petryshyn R. 1991. Phosphorylation and proteolytic degradation of nucleolin from 3T3-F442A cells. *Biochemical and biophysical research communications* **180**: 716-723.
- Wicke S, Costa A, Munoz J, Quandt D. 2011. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Molecular phylogenetics and evolution* **61**: 321-332.
- Woolford JL, Jr. 1991. The structure and biogenesis of yeast ribosomes. *Advances in genetics* **29**: 63-118.
- Woolford JL, Jr., Baserga SJ. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**: 643-681.
- Xu Z, Anderson R, Hobman TC. 2011. The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus. *Journal of virology* **85**: 5571-5580.
- Xu Z, Hobman TC. 2012. The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. *Virology* **433**: 226-235.
- Yakura K, Nishikawa K. 1992. The nucleotide sequence of the rDNA spacer region between the 25S and 18S rRNA genes in a species of the genus *Vicia*, *V. hirsuta*. *Plant molecular biology* **19**: 537-539.
- Yano H, Sato S. 2002. Combination of electron microscopic in situ hybridization and anti-DNA antibody labelling reveals a peculiar arrangement of ribosomal DNA in the fibrillar centres of the plant cell nucleolus. *Journal of electron microscopy* **51**: 231-239.
- Yelagandula R, Stroud H, Holec S, Zhou K, Feng S, Zhong X, Muthurajan UM, Nie X, Kawashima T, Groth M et al. 2014. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. *Cell* **158**: 98-109.
- Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y. 2007. Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Molecular cell* **27**: 585-595.
- Yuan X, Zhao J, Zentgraf H, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I. 2002. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO reports* **3**: 1082-1087.
- Yuan X, Zhou Y, Casanova E, Chai M, Kiss E, Grone HJ, Schutz G, Grummt I. 2005. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Molecular cell* **19**: 77-87.
- Zachova D, Fojtova M, Dvorackova M, Mozgova I, Lermontova I, Peska V, Schubert I, Fajkus J, Sykorova E. 2013. Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in *Arabidopsis*. *Physiologia plantarum* **149**: 114-126.
- Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D. 2013. The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* **153**: 193-205.
- Zemp I, Kutay U. 2007. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS letters* **581**: 2783-2793.
- Zhang B, Wang H, Jiang B, Liang P, Liu M, Deng G, Xiao X. 2010a. Nucleolin/C23 is a negative regulator of hydrogen peroxide-induced apoptosis in HUVECs. *Cell stress & chaperones* **15**: 249-257.

- Zhang C, Guo H, Zhang J, Guo G, Schumaker KS, Guo Y. 2010b. Arabidopsis cockayne syndrome A-like proteins 1A and 1B form a complex with CULLIN4 and damage DNA binding protein 1A and regulate the response to UV irradiation. *The Plant cell* **22**: 2353-2369.
- Zhang H, He X, Zhu JK. 2013. RNA-directed DNA methylation in plants: Where to start? *RNA biology* **10**: 1593-1596.
- Zhang J, Tsaprailis G, Bowden GT. 2008. Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation. *Cancer research* **68**: 1046-1054.
- Zhang L, Hu Y, Yan S, Li H, He S, Huang M, Li L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant molecular biology* **79**: 285-293.
- Zhang Y, Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* **15**: 2343-2360.
- Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhart WA, Xiong Y. 2003. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Molecular and cellular biology* **23**: 8902-8912.
- Zhou Y, Santoro R, Grummt I. 2002. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *The EMBO journal* **21**: 4632-4640.
- Zhu Y, Dong A, Shen WH. 2012. Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta* **1819**: 343-348.
- Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP. 2004. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular biology of the cell* **15**: 81-90.
- Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, Henikoff S. 2008. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**: 125-129.
- Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of experimental botany* **61**: 1959-1968.
- Zomerdijk JC, Beckmann H, Comai L, Tjian R. 1994. Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science* **266**: 2015-2018.

## **Résumé**

Chez les eucaryotes, les gènes d'ARNr 45S sont présents en un grand nombre de copies organisées dans des régions chromosomiques appelées NOR pour « Nucleolus Organizer Region ». Cependant, seule une fraction de ces gènes est activement exprimée et leur activation/répression est majoritairement contrôlée par des mécanismes épigénétiques. Parmi les facteurs requis pour l'expression de ces gènes, se trouve la nucléoline, une protéine majeure du nucléole. Chez *A. thaliana*, la protéine NUC1 est nécessaire pour le maintien de la méthylation et le contrôle de l'expression de variants spécifiques des gènes d'ARNr. De manière intéressante, contrairement aux animaux et aux levures, le génome des plantes possède un deuxième gène codant la nucléoline : *NUC2*. Au cours de cette étude, nous avons montré que les deux gènes *NUC1* et *NUC2* sont nécessaires pour la survie de la plante. L'étude de plantes mutées pour le gène *NUC2* a révélé que cette protéine est impliquée dans l'organisation et l'expression des ADNr mais par des mécanismes antagonistes à ceux de son homologue *NUC1*. En effet, l'absence de la *NUC2* induit une hyperméthylation des ADNr ainsi qu'une réorganisation spatiale et une variation du nombre de copie des différents variants des gènes d'ARNr. Par ailleurs, la protéine *NUC1* se lie aux gènes actifs alors que la protéine *NUC2* est associée à la chromatine condensée en périphérie du nucléole. En parallèle, nous avons montré que l'expression des ADNr est affectée en réponse à la chaleur et que le gène *NUC2* est fortement induit. L'ensemble de ces données suggèrent un potentiel rôle de la *NUC2* dans la répression des gènes d'ARNr au cours du développement et en réponse au stress.

---

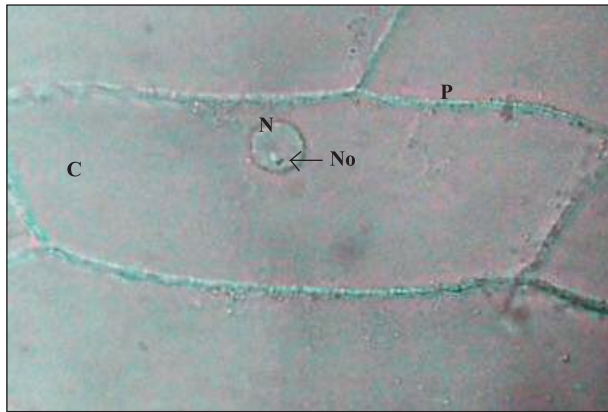
## **Abstract**

In eukaryotes, 45S rRNA genes are highly repeated and localize in chromosomal regions known as NOR for "Nucleolus Organizer Regions". However, only a small proportion of these genes is transcriptionally active and their activation and/or repression depends on epigenetic mechanisms. One of the factors involved in rDNA expression is nucleolin, a major nucleolar protein. In *A. thaliana*, nucleolin protein NUC1 is required to maintain rDNA methylation and control expression of specific rDNA variants. Interestingly, in contrast to animals and yeast, plants encode a second nucleolin gene: *NUC2*. Here, we show that *NUC1* and *NUC2* genes are both required for plant survival. Analysis of *nuc2* mutant plants reveals that *NUC2* protein is required for rDNA organization and expression but with mechanisms antagonistic to those described for its homologue *NUC1*. In fact, loss of *NUC2* induces rDNA hypermethylation and a spatial reorganization of rRNA genes with changes in copy numbers of rDNA variants. Moreover, *NUC1* protein binds transcriptionally active rRNA genes while *NUC2* protein associates with condensed chromatin in the periphery of the nucleolus. Furthermore, we show that rRNA gene expression is affected in response to heat shock and that the *NUC2* gene is strongly induced. Altogether, our results suggest a potential role of *NUC2* protein in rDNA repression during development and/or in response to stress.

# Introduction générale

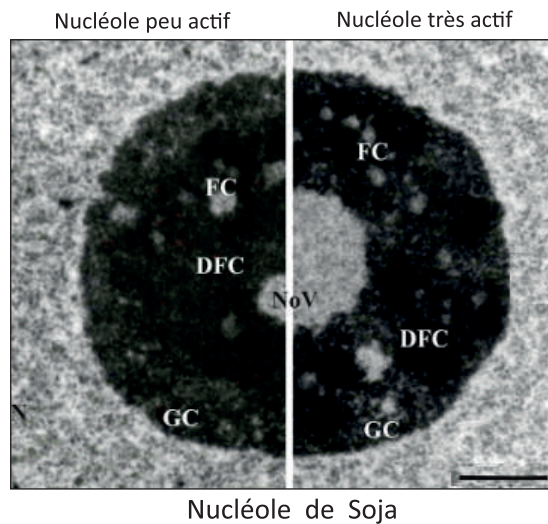
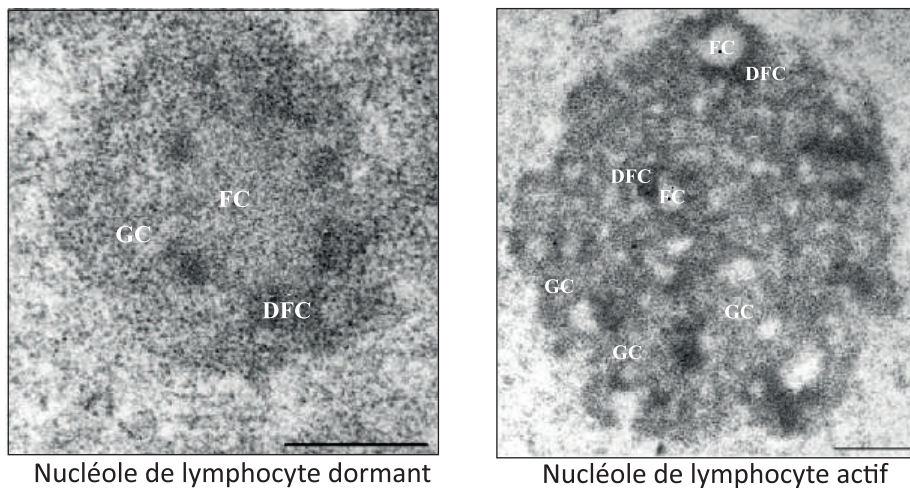
---





**Figure 1 :** Observation au microscope optique d'une cellule d'oignon (X 600)

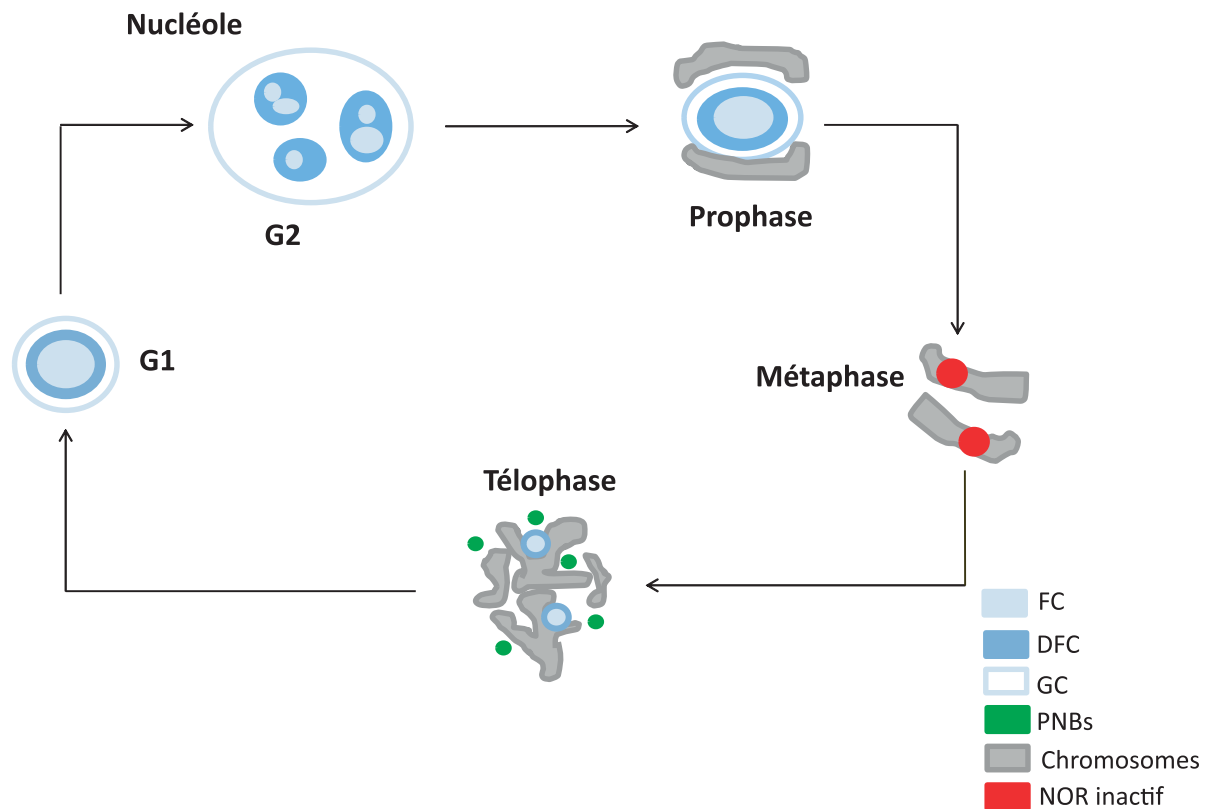
Photographie d'une cellule d'oignon en microscopie optique. La cellule végétale est entourée par la paroi pecto-cellulosique (P). Le Noyau (N) est séparé du cytoplasme (C) par une membrane. Le nucléole (No) apparaît comme une structure bien définie au sein du noyau.

**A****B**

**Figure 3** : Structure du nucléole et activité cellulaire

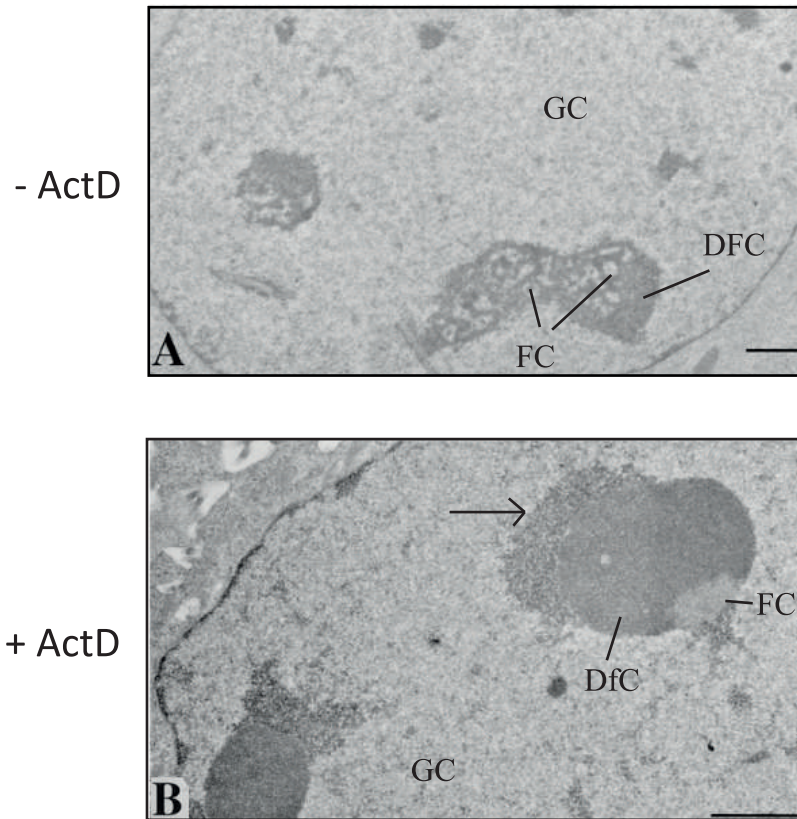
Photographies au microscope électronique de nucléoles montrant la réorganisation fonctionnelle après activation de la cellule. **A** : Nucléole de plantes (Soja) : A gauche, nucléole peu actif avec un faible nombre de FCs et une petite cavité nucléolaire. A droite, un nucléole avec une forte activité transcriptionnelle possédant plusieurs petits FCs et une grande cavité nucléolaire centrale (Stepinski, 2014). La barre d'échelle indique 2  $\mu$ m.

**B** : Lymphocyte humain avant et après stimulation. A gauche, un lymphocyte dormant ou inactif. Le FC est très large et entouré d'un fin DFC et d'un large GC. A droite, un lymphocyte activé après 48 h de stimulation (photo-hématoglobuline). Le GC est fortement réduit en raison de la mobilisation des particules pré-ribosomiques vers le cytoplasme. Plusieurs petits FCs sont détectés avec des intrusions de DFC (Raska et al., 2004). La barre d'échelle indique 500 nm.



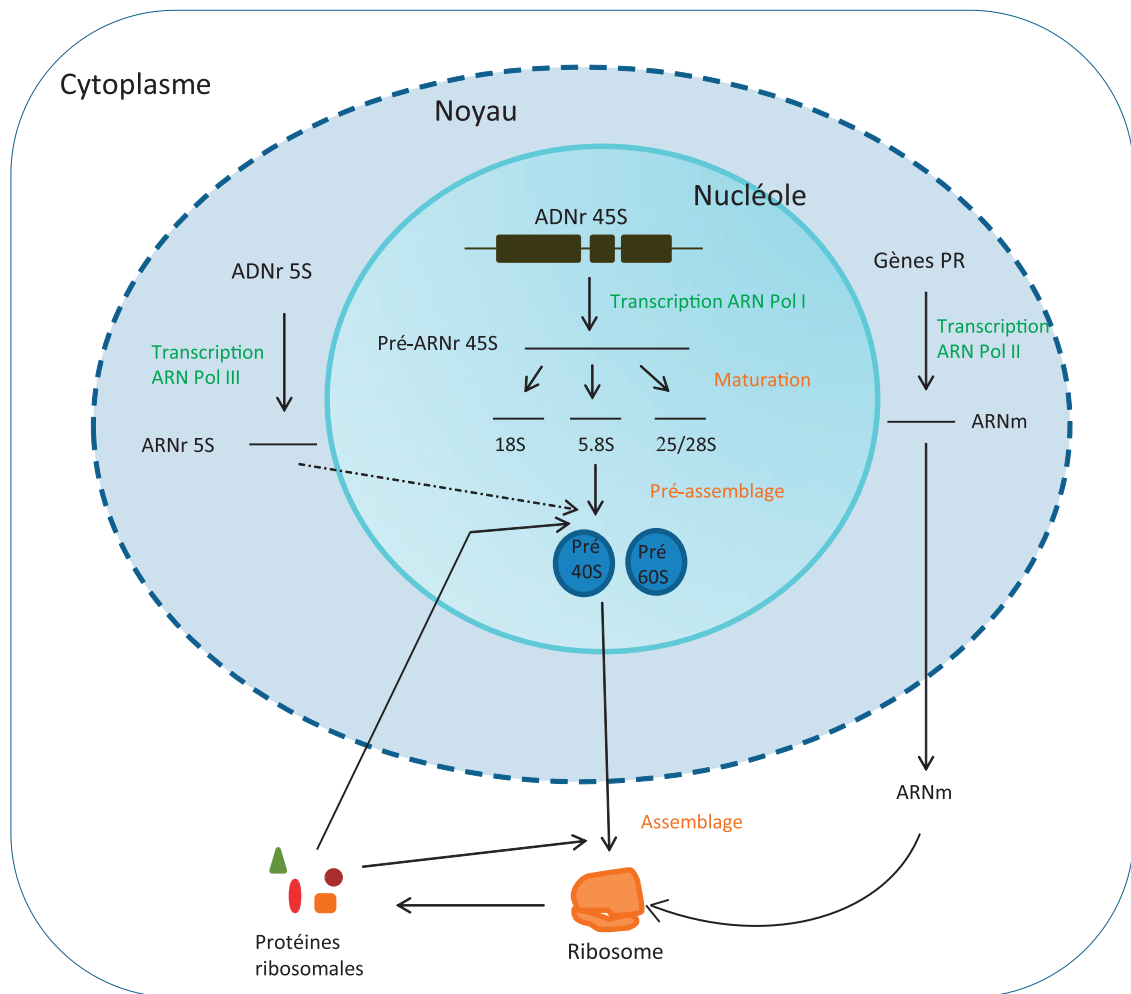
**Figure 4** : Dynamique du nucléole au cours de la mitose

Schéma représentant l'évolution de la structure du nucléole au cours du cycle cellulaire chez les mammifères. A l'interphase (phase G2), la cellule est très active et le nucléole atteint sa taille maximale. En fin de phase G2, le nucléole commence à se désassembler de façon séquentielle : les complexes de maturation sont vidés peu à peu du nucléole induisant une diminution du GC. À l'entrée de la mitose, en prophase, les chromosomes commencent à se condenser. Le GC se réduit suite à la relocalisation des machineries de maturation tardives vers la périphérie des chromosomes et le DFC commence également à disparaître. A partir de la métaphase, le nucléole n'est plus visible. La transcription des gènes d'ARNr est inhibée par la CDK1 (rouge). Cette organisation est conservée tout au long de l'anaphase lorsque les chromosomes migrent aux pôles de la cellule. À partir de la télaphase, les chromosomes se décondensent et la transcription des gènes d'ARNr est à nouveau activée. Les composants nécessaires à la maturation des ARNr sont redistribués dans les PNBs (vert) qui sont redirigés vers les NORs redevenus actifs. Le réassemblage du nucléole en fin de mitose dépend de la coordination à la fois de la transcription des ADNr et du recrutement des complexes de maturation. Un nouveau nucléole commence à se former en phase G1 et devient totalement actif à partir de l'interphase.



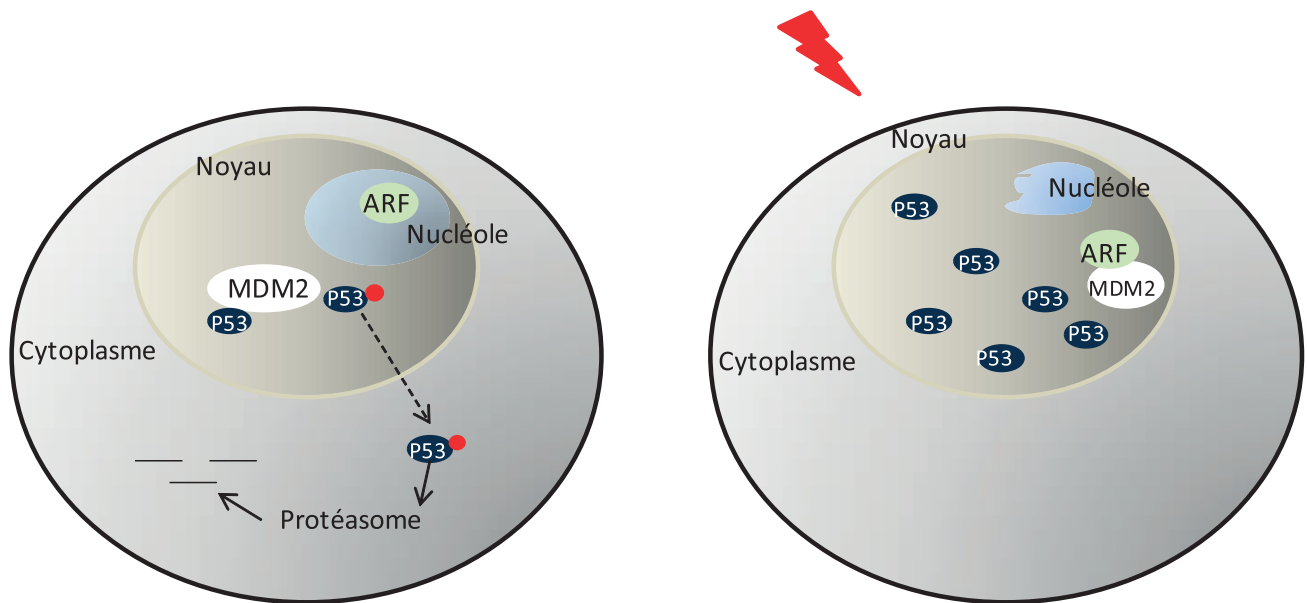
**Figure 5 :** Ségrégation des différents compartiments du nucléole suite à l'inhibition de la transcription

Photographie au microscope électronique de nucléoles de cellules humaines (HeLa). **A :** Nucléole en phase G1 en absence de traitement à l'Actinomycine D (ActD). On distingue le FC, DfC et GC. **B :** Nucléole en interphase après traitement à l'ActD (0.04 µg/ml). Les protéines impliquées dans la transcription forment un croissant (indiqué par la flèche) au-dessus du DfC (Dousset et al., 2000). La barre d'échelle représente 1 µm.



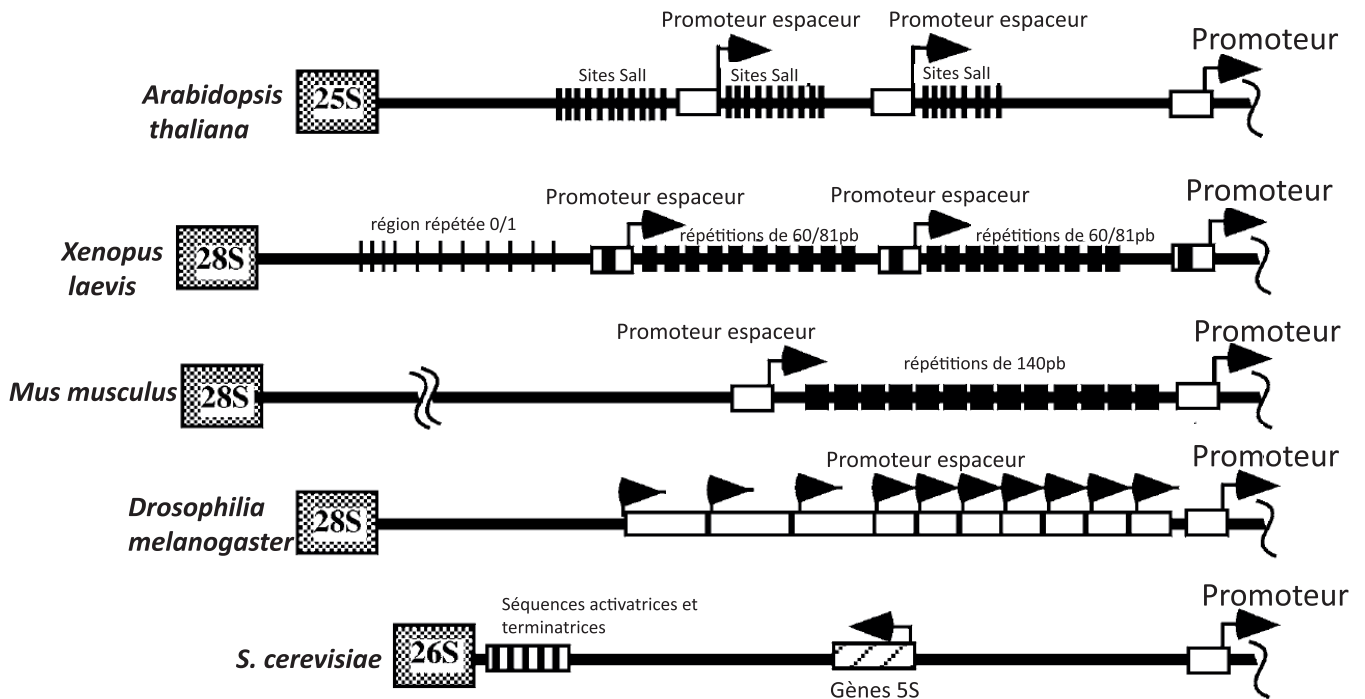
**Figure 6** : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

La plupart des étapes de la biogenèse des ribosomes se déroulent au sein du nucléole. Les gènes ribosomiques (ADNr 45S) codant les ARNr 18S, 5.8S et 25/28S sont transcrits par l'ARN Pol I puis maturés au sein du nucléole. En parallèle, les gènes d'ARNr 5S sont transcrits par l'ARN Pol III dans le noyau puis importés dans le nucléole. Les gènes codant les protéines ribosomiques (PR) sont transcrits par l'ARN Pol II dans le noyau. Les ARNm sont exportés vers le cytoplasme où ils sont traduits en PR grâce aux ribosomes. Une partie de ces PR sont importées vers le nucléole où elles vont être assemblées avec les ARNr (18S, 5.8S, 25/28S et 5S) en particules pré-ribosomiques. Les autres PR s'associeront aux pré-ribosomes au moment de l'assemblage final.



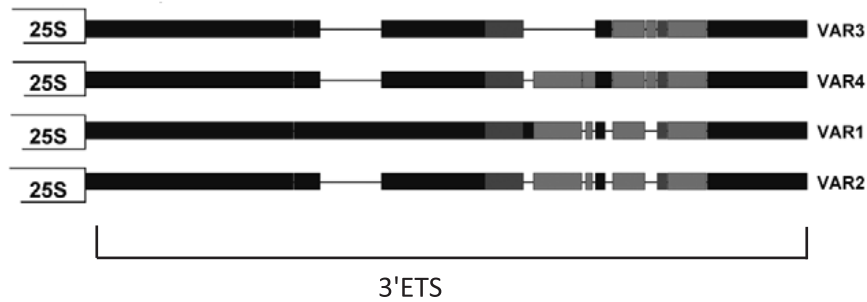
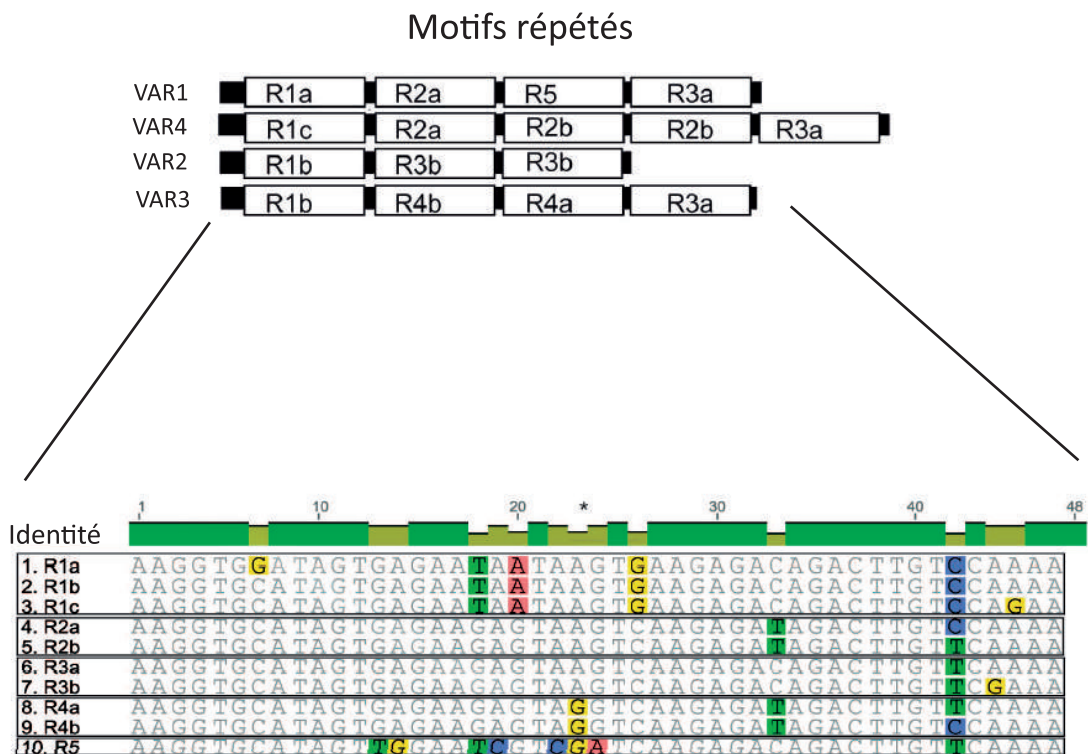
**Figure 7 :** Représentation schématique de la régulation de la protéine P53 en réponse au stress

A gauche, le schéma représente une cellule dans les conditions normales de croissance. La protéine P53 est maintenue à un faible niveau dans la cellule suite à son ubiquitination (rouge) par la protéine MDM2 et sa dégradation dans le cytoplasme par le protéasome. La protéine ARF, qui régule l'activité de MDM2, est séquestrée dans le nucléole. A droite, en condition de stress, la structure du nucléole est affectée. La protéine ARF est alors relâchée du nucléole et migre dans le noyau où elle s'associe avec MDM2, affectant ainsi son activité. La protéine P53 n'est alors plus ubiquitinée et s'accumule dans le noyau.



**Figure 9 :** Comparaison des IGS des gènes d'ARNr de différents organismes eucaryotes (Pikaard, 2002)

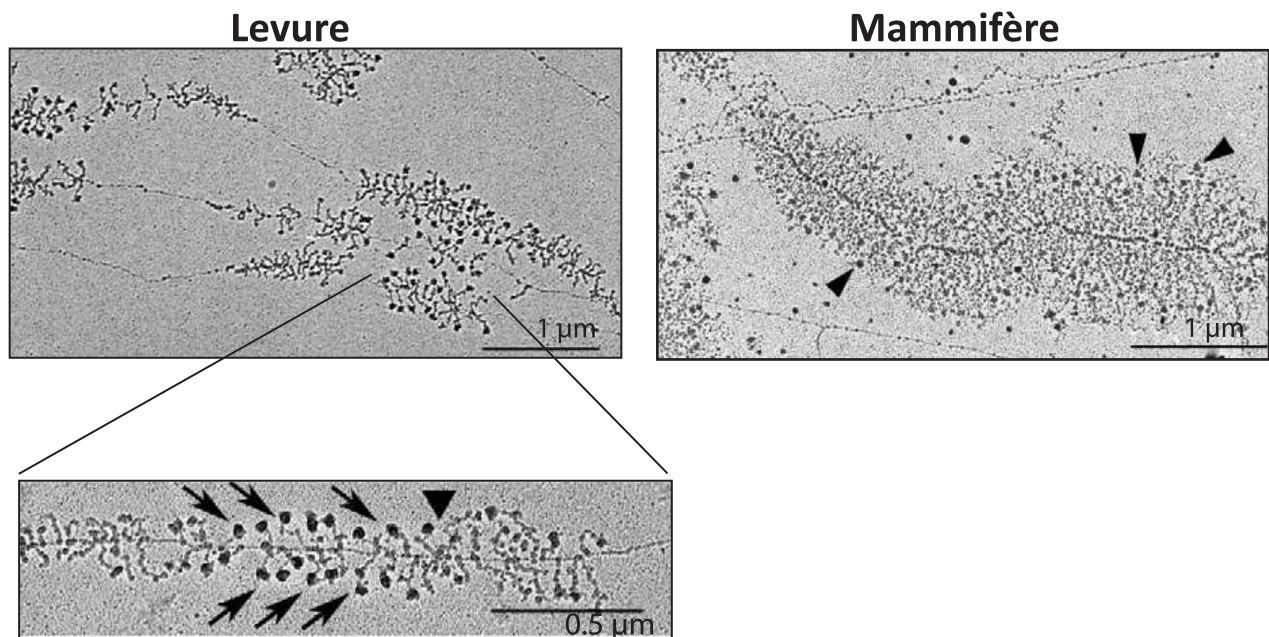
Les IGS des eucaryotes supérieurs (*Xenopus laevis*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* et *Mus musculus*) sont généralement composés de promoteurs espaceurs séparés les uns des autres par des séquences répétées sauf chez la drosophile. Ces éléments répétés ne présentent aucune similarité de séquence bien que chacune possède la capacité d'activer la transcription lorsqu'elles sont fusionnées au promoteur des gènes d'ARNr de *X. laevis* (Doelling and Pikaard, 1993; Pikaard et al., 1990). En revanche, l'organisation des IGS chez la levure est quelque peu différente. Aucune séquence répétée n'a été identifiée et un exemplaire du gène 5S transcrit par l'ARN Pol III est localisé en orientation inverse des gènes 35S transcrits par l'ARN Pol I.

**A****B**

**Figure 10 :** Polymorphisme de la région 3'ETS des gènes d'ARNr chez *A. thaliana*

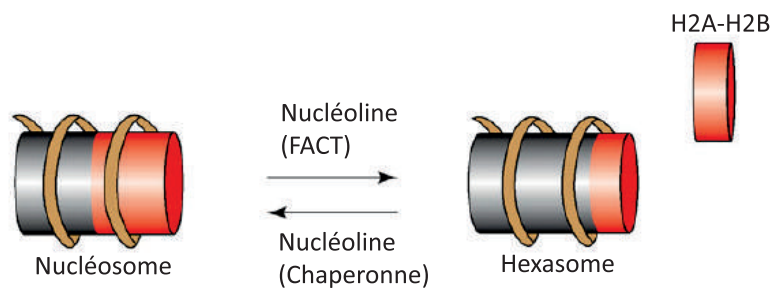
**A :** Représentation schématique des 4 variants dans la région 3'ETS (Pontvianne et al., 2010). Les rectangles schématisent la conservation des séquences (de la plus conservée (noir) à la moins conservée (gris clair)). Les lignes joignant les rectangles représentent les délétions de séquences. **B :** Organisation structurale de la région 3'ETS (adaptée de (Abou-Ellail et al., 2011)). En haut est représenté le motif de 47pb répété plusieurs fois en fonction des différents variants. Ces répétitions présentent des polymorphismes au sein de leur séquence permettant de générer 5 types de motifs nommés R1, R2, R3, R4 et R5 dont l'organisation permet de distinguer les 4 variants entre eux. En bas, un alignement des séquences répétées est présenté avec les mutations nucléotidiques.





**Figure 11** : Transcription par l'ARN Pol I : formation de structures en « arbres de Noël »

Photographies au microscope électronique des gènes d'ARNr en cours de transcription après étalement de la chromatine sur des nucléoles de levures et de souris (Raska et al., 2006). Chez la levure, différents niveaux de charge en ARN Pol I sont observés pour les gènes transcrits. Un agrandissement de l'image montre la présence des complexes de maturation (indiqués par les flèches) à l'extrémité des branches correspondant aux ARNr en cours de transcription. Chez la souris, seuls les ADNr actifs sont visualisés. Le niveau de charge en ARN Pol I est au maximum et les complexes de maturation (indiqués par les flèches) sont également associés à l'extrémité des transcrits.



**Figure 17:** Les différentes activités FACT et chaperonne d'histone de la nucléoline

*In vitro*, la nucléoline, de façon très similaire au complexe FACT, induit la déstabilisation du nucléosome et la formation d'un hexasome suite au désassemblage des dimères H2A-H2B. Ceci facilite le passage de l'ARN Pol II le long de la chromatine au cours de l'élongation transcriptionnelle. Au contraire, son activité de chaperonne d'histone lui permet de reformer la structure nucléosomale après le passage de l'ARN polymérase (adapté de ((Mongelard and Bouvet, 2007))).



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## Review

## Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription

Nathalie Durut, Julio Sáez-Vásquez\*

CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, 66860 Perpignan, France

Univ. Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, F-66860 Perpignan, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 July 2014

Received in revised form 8 September 2014

Accepted 9 September 2014

Available online xxxxx

## Keywords:

Nucleolin

rDNA

Chromatin

Epigenetics

Nucleolus

RNA pol I

## ABSTRACT

Nucleolin is a major nucleolar protein conserved in all eukaryotic organisms. It is a multifunctional protein involved in different cellular aspects like chromatin organization and stability, DNA and RNA metabolism, assembly of ribonucleoprotein complexes, cytokinesis, cell proliferation and stress response. The multifunctionality of nucleolin is linked to its tripartite structure, post-translational modifications and its ability of shuttling from and to the nucleolus/nucleoplasm and cytoplasm. Nucleolin has been now studied for many years and its activities and properties have been described in a number of excellent reviews.

Here, we overview the role of nucleolin in RNA polymerase I (RNAPI) transcription and describe recent results concerning its functional interaction with rDNA chromatin organization. For a long time, nucleolin has been associated with rRNA gene expression and pre-rRNA processing. However, the functional connection between nucleolin and active versus inactive rRNA genes is still not fully understood. Novel evidence indicates that the nucleolin protein might be required for controlling the transcriptional ON/OFF states of rDNA chromatin in both mammals and plants.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nucleolin was first described in 1973 in rat protein extracts and initially called “C23” because of its mobility on a two-dimensional gel (Orrick et al., 1973). Nucleolin was also described as a 100–110 kDa protein, although its predicted molecular weight is around 77 kDa (Lapeyre et al., 1986). This discrepancy was attributed to its N-terminal amino acid composition (reviewed by (Ginisty et al., 1999)). Now, the name of nucleolin is widely used for this nucleolar protein. Furthermore, it was detected by silver staining as it is an Ag-NOR (silver stained-Nucleolar Organizer Region) protein (Goodpasture and Bloom, 1975; Fernandez-Gomez et al., 1983; Roussel et al., 1992). Interestingly, Ag-staining is observed in NORs displaying secondary constrictions (transcriptionally active) but not in NOR lacking these constrictions (transcriptionally inactive) (Hernandez-Verdun et al., 1982; Lacadena et al., 1984; Haasen et al., 1999). Thus, this early work indicated functional interaction of nucleolin with active rDNA chromatin. Likewise, since its discovery, several publications have shown that nucleolin might

play a dual role in rDNA gene expression. Indeed, nucleolin protein seems to have both positive and negative effects on rDNA transcription and/or pre-rRNA processing.

## 1.1. Nucleolin a phylogenetically conserved protein gene

Nucleolin genes are found in all animal, yeast and plant species (Ginisty et al., 1999; Gabellini et al., 2002; Tajrishi et al., 2011). Most animal cells, including human (Srivastava and Pollard, 1999), mouse (Bourbon et al., 1988) and hamster (Lapeyre et al., 1986) contain one nucleolin gene per haploid genome. However, tetraploid species like *Cyprinus carpio* (Quezada et al., 2006) or *Xenopus laevis* (Messmer and Dreyer, 1993) contain up to three nucleolin genes. Yeast cells also have a single nucleolin protein gene: *NSR1* (Nuclear Signal Recognition) in *Saccharomyces cerevisiae* and *GAR2* (glycine–arginine-rich 2) in *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo and Inouye, 1992; Gulli et al., 1995). In contrast, the genomes of plant species contain at least two nucleolin protein genes. These include monocotyledonous and dicotyledonous plants like rice, sorghum, maize, poplar and *Arabidopsis thaliana* (Saez-Vasquez and Medina, 2008; Tajrishi et al., 2011).

The structure of nucleolin proteins has been highly conserved during evolution; it contains three domains with similar arrangements in yeast, plants and animals (Fig. 1). The N-terminal or acidic domain, the central domain or RNA Recognition Motifs (RRMs) and the C-terminal or glycine/arginine-rich domain (GAR/RGG). The N-terminal domain has a variable number of acidic stretches among the nucleolin proteins and is involved in protein–protein interactions (Bharti et al., 1996; Edwards et al., 2000). Acidic sequences interact with histone H1 and

**Abbreviations:** NUC/NCL, nucleolin; RNAPI, RNA polymerase I; NSR1, Nuclear Signal Recognition 1; GAR, glycine–arginine-rich; RGG, Arg-Gly-Gly repeats; RRM, RNA Recognition Motifs; DFC, dense fibrillar component; FC, fibrillar centers; TIF-1A, Transcription Initiation Factor 1A; CKII, Casein Kinase II; NopA64, Nucleolar Protein A64; UBF, Upstream Binding Factor; snoRNP, small nucleolar RiboNucleoProtein; 5'ETS, 5'-external transcribed spacer; FACT, Facilitates Chromatin Transcription; TTF-1, Transcription Terminator Factor 1; NoRC, Nucleolar Remodelling Complex; HDAC1, histone deacetylase 1; CSB/CSA, Cockayne Syndrome Group B/A; NORs, Nucleolus Organizer Regions.

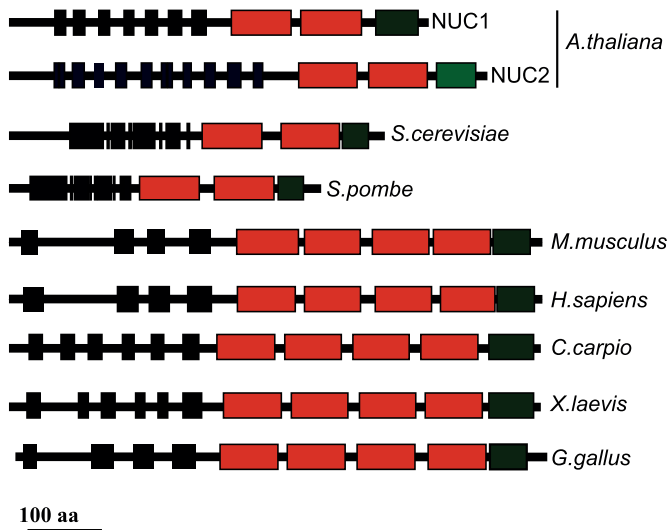
\* Corresponding author.

E-mail address: saez@univ-perp.fr (J. Sáez-Vásquez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.023>

0378-1119/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Durut, N., Sáez-Vásquez, J., Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription, Gene (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.023>



**Fig. 1.** Schematic representation of nucleolin and nucleolin-like protein structures: from *A. thaliana* (NUC1 and NUC2), *Schizosaccharomyces cerevisiae* (NSR1p), *Schizosaccharomyces pombe* (GAR2p), *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Cyprinus carpio*, *Xenopus laevis* and *Gallus gallus*. The blue dark gray boxes correspond to the acidic stretches in the N-terminal domain, the red boxes refer to the RRM motifs, and the green boxes represent the GAR domain. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

induce chromatin decondensation (Erard et al., 1988). The central domain contains two RRM in yeast and plants and four in animals. The RRMs are less conserved within the same protein compared with RRMs from different proteins (Ginisty et al., 1999). The C-terminal domain contains the so-called GAR (glycine and arginine-rich) or RGG (Arg-Gly-Gly repeats) domain. The GAR/RGG sequence is not well conserved across evolution (Ginisty et al., 1999; Tajrishi et al., 2011). Noteworthy, in *Arabidopsis* the potential NUC2-GAR domain is much less well conserved than the NUC1-GAR domain compared with the nucleolin GAR domains from other species (Pontvianne et al., 2007).

The GAR domain is important for binding nucleic acids, nucleolar localization, interaction with ribosomal proteins (RPs) and the assembly of pre-ribosomal particles (Ginisty et al., 1999).

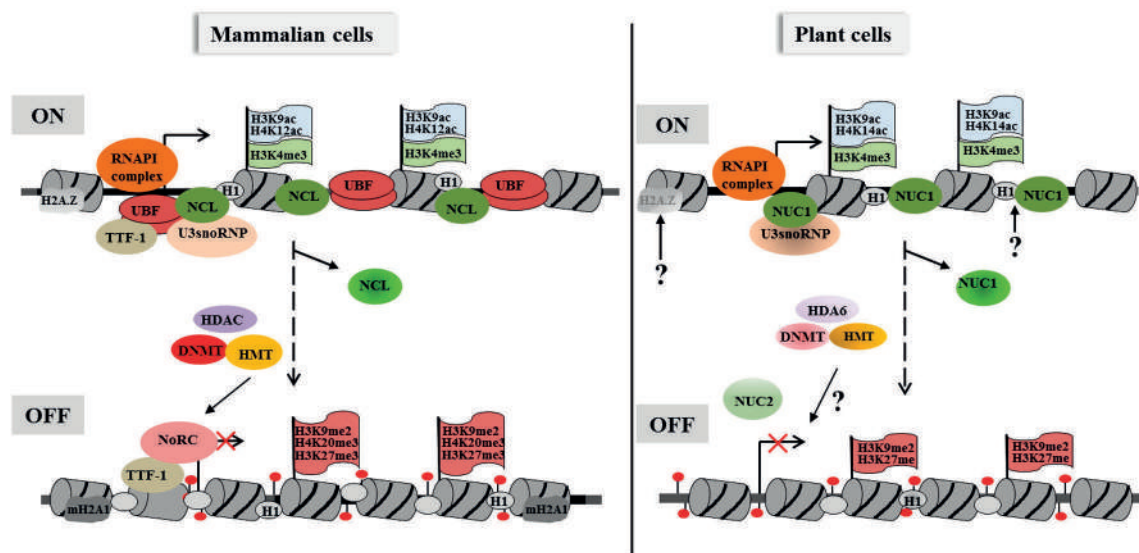
## 2. Nucleolin and rRNA genes

### 2.1. Nucleolar localization of nucleolin

Nucleolin plays a key role in ribosome biogenesis, including transcription and processing of rRNA as well as ribosome assembly and intercellular transport. The localization and distribution of nucleolin in the different nucleolar compartments are linked to the different processes taking place in the nucleolus (Ginisty et al., 1999; Srivastava and Pollard, 1999; Tajrishi et al., 2011). In yeast, plant and animal cells, pre-rRNA transcription takes place at the junction between fibrillar centers (FC) and dense fibrillar component (DFC) where RNAPI and other specific transcription factors associate to form the RNAPI pre-initiation complex at rDNA promoter (Grummt, 2003; Raska, 2003). In agreement with a role in rDNA expression, nucleolin from vertebrates and yeast predominantly localizes in the junction of FC/DFC and in the DFC compartment (reviewed in Ginisty et al., 1999). Conversely, inhibition of RNAPI transcription induces nucleolin delocalization from DFC (Escande et al., 1985). Similarly, nucleolin from *Arabidopsis* and other plants is present in DFC around FCs (de Carcer and Medina, 1999; Pontvianne et al., 2007; Stepinski, 2009).

### 2.2. Nucleolin regulates RNAPI transcription

Early studies suggested that nucleolin protein could play a repressive role in RNAPI transcription. It was shown that injection of nucleolin antisense lead to enhanced rRNA transcription about 2–3.5 fold in *Chironomus tentans* glands (Egyhazi et al., 1988) while injection of a 2–4 fold excess of nucleolin in *X. laevis* stage IV oocytes negatively affects accumulation of pre-rRNAs (Roger et al., 2002). However, inhibition of nucleolin gene expression in vivo, instead of microinjecting nucleolin protein into oocytes, provokes contradictory effects. Indeed,



**Fig. 2.** Comparison of models for nucleolin in rRNA genes transcribed by RNA pol I (RNAPI) in mammals and plant cells. rDNA exists in two functional states. At active genes (ON), the promoter is hypomethylated and histones possess euchromatic marks such as acetylated histones H3, H4 and tri-methylation of histone H3 (H3K4me3). At silent genes (OFF), the promoter is hypermethylated and histones possess heterochromatic marks such as di-methylation (H3K9me2) and mono-methylation (H3K27) and/or tri-methylation of histone H3 (H3K27) and H4 (H4K20). Nucleosomes containing histone variant H2A.Z localize near to promoters in mammals and likely in plants. Nucleolin protein (NCL in mammals and NUC1 in plants) associates with transcriptionally active rDNA units, binds H1 and interacts with the U3snoRNP complex. In mammalian cells, nucleolin blocks TTF-1 rDNA binding and its interaction with repressive chromatin remodeler complex NoRC. Decreased amounts of NCL allow TTF-1 and NoRC interaction and recruitment of DNA methyltransferases (DNMT), histone deacetylases (HDAC) and histone methyltransferases (HMT) for chromatin establishment. Histone variant macroH2A.1 accumulates on silent rDNA nucleosomes. In plants, NUC2 expression is up-regulated in the absence of NUC1 and is associated with rDNA heterochromatin establishment during seedling development. The molecular mechanism linking NUCs with plant remodeler complexes, DNA and histone modification activities remains unknown.

partial knock-down of nucleolin by RNAi or by interrupting the nucleolin gene sequence with a T-DNA sequence, revealed an RNAPI transcription activator role of nucleolin in animal and plant cells rather than a repressor role.

First, conditional knockout and RNA interference experiments allowed the demonstration that decreased nucleolin gene expression induces inhibition of RNAPI transcription and provokes modification of nucleolus structure and organization in mammalian and chicken cells, i.e. reduced nucleolus size and segregation of nucleolar components (Ma et al., 2007; Rickards et al., 2007; Storck et al., 2007; Ugrinova et al., 2007). The extent of reduction of RNAPI transcription is correlated with the level of nucleolin knock-down (Rickards et al., 2007). Additionally, the effects on nucleolus structure are similar to those observed after inactivation of RNAPI by actinomycin D (Puvion-Dutilleul et al., 1992) or inhibition of TIF-IA factor (Yuan et al., 2005).

In agreement with an RNAPI activator role, overexpression of nucleolin in HeLa cells leads to increased rDNA transcription (Cong et al., 2012).

It is worth mentioning that inactivation of nucleolin, either by siRNA or conditional knockout, affects cell growth and proliferation and increases apoptosis (Ugrinova et al., 2007; Storck et al., 2009). The null mutation of the *NSR1* or *GAR2* in yeast is not lethal, but causes severe growth defects (Lee et al., 1992; Gulli et al., 1995). Knockout of *NSR1* or *GAR2* leads also to accumulation of 35S pre-rRNA and induces nucleolus reorganization (Leger-Silvestre et al., 1997).

In plants, knockout of the nucleolin gene *NUC1* by a T-DNA insertion provokes growth and developmental defects in *Arabidopsis* (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). In contrast, knockout of the second nucleolin gene (*NUC2*) induces only flowering delay (Durut et al., 2014). Interestingly, in both mutant plants, rRNA gene expression is deregulated, but only *NUC1* mutation affects nucleolus shape and structure. In *nuc1* mutant plants, nucleolin activity is not completely depleted. Indeed, the *NUC2* gene is up-regulated and likely able to rescue, at least partially, the lack of *NUC1* (Pontvianne et al., 2007, 2010). In agreement, disruption of the two nucleolin genes is lethal indicating that expression of nucleolin gene is essential for plant survival (Durut et al., 2014).

### 2.3. Nucleolin and rRNA gene expression

Nucleolin over-expression in highly proliferative cells, including cancerous cells, can be linked to high rRNA synthesis (Srivastava and Pollard, 1999; Abdelmohsen and Gorospe, 2012). Similarly, a correlation of increased nucleolin-like protein expression with the cell cycle and cell proliferation has also been demonstrated in plants (Bogre et al., 1996; Reichler et al., 2001; Gonzalez-Camacho and Medina, 2006). During seed germination, a stage characterized by its fast growth, reactivation of rDNA transcription and pre-rRNA processing is observed in concomitance with up-regulation of nucleolin (Villa-Hernandez et al., 2013). Higher rRNA gene expression during seed germination is associated with rDNA chromatin decondensation and acetylation of rRNA gene promoter (Earley et al., 2010; Zhang et al., 2012).

In contrast, during development or in response to environmental conditions, up-regulation of nucleolin gene expression might repress rDNA transcription. In cold acclimated carp an increased amount of nucleolin inhibits rDNA transcription concomitant with nucleolus segregation (Alvarez et al., 2003). Down-regulation of rDNA transcription might function as a strategy to maintain cellular homeostasis under stress conditions, as it limits energy consumption in disadvantageous conditions. Similarly, induced expression of *NUC2* gene in *Arabidopsis* is associated with repression of specific rRNA genes during developmental transitions (Durut et al., 2014). Interestingly, *Arabidopsis* and carp encode at least two distinct nucleolin proteins and differential expression of specific nucleolin forms might be required for repression of rRNA expression.

The cellular amount of nucleolin seems not to be sufficient to up- or down-regulate rRNA gene expression. Indeed, phosphorylation (Tajrishi et al., 2011), glycosylation (Carpantier 2005), methylation (Pellar and DiMario, 2003) and acetylation (Das et al., 2013) might negatively or positively control nucleolar localization and multiple activities of nucleolin. Therefore, we can expect that cellular, developmental and/or environmental conditions may induce post-translational modifications of nucleolin and modify rDNA gene expression.

### 2.4. Nucleolin in coupling RNA pol I transcription and processing of pre-rRNA

Nucleolin activity is not restricted to rDNA transcription. Thirty years ago, a model was proposed in which nucleolin may form a bridge between chromatin and nascent pre-rRNA transcripts provoking blockage of transcription. Phosphorylation of nucleolin might induce protein cleavage, probably required to release transcription and association of protein products with nascent pre-rRNA transcripts (Bouche et al., 1984). Although the biological significance of nucleolin phosphorylation/proteolysis is still controversial, nucleolin protein is certainly implicated in molecular mechanisms linking rDNA transcription and pre-rRNA processing. Besides, the identification of CKII activity associated with RNAPI holoenzymes (Albert et al., 1999; Saez-Vasquez et al., 2001) suggests that translocation of nucleolin from rDNA to pre-rRNA may be regulated by CKII phosphorylation.

The existing data also show that nucleolin protein interacts with the U3 snoRNP (Saez-Vasquez et al., 2004a, b; Turner et al., 2009). The U3 snoRNP complex binds the 5'-external transcribed spacer (5'ETS) of nascent pre-rRNA and is involved in the coordination of transcription and early pre-rRNA (Granneman and Baserga, 2005). Nucleolin protein also interacts with pre-rRNA specifically through its RRM motif and is required for the first step of pre-rRNA processing in the 5'ETS (Allain et al., 2000; Ginisty et al., 2000). Furthermore, in vitro studies have demonstrated that nucleolin is required for pre-rRNA processing in mouse S100 cell extract and that processing activation is dependent on U3snoRNA (Ginisty et al., 1998).

In plants, early in the nineties it was shown that the nucleolin-like protein NopA64 co-localizes with immune-related UBF and fibrillarin proteins in the DFC surrounding the FC of the nucleolus (Cerdido and Medina, 1995). UBF is required for rRNA transcription initiation (Sanij et al., 2008) whereas fibrillarin associates with box C/D small nucleolar RNA (snoRNA) including U3 (Barneche et al., 2000). This observation provided early evidence of a role for nucleolin in controlling both pre-rRNA transcription and processing. Later, it was demonstrated that nucleolin associates with the U3 snoRNP complex, isolated from cauliflower (Saez-Vasquez et al., 2004a; Samaha et al., 2010). Furthermore, it was shown that the nucleolin-U3snoRNP complex binds rDNA (Caparros-Ruiz et al., 1997) and cleaves pre-rRNA specifically at the primary cleavage site located in the 5'ETS (Saez-Vasquez et al., 2004a).

Interestingly, it was recently shown that Nop1/fibrillarin is able to methylate glutamine of histone H2A. Glutamine methylation is restricted to 35S rDNA unit and is required for binding of the histone chaperone FACT (Tessarz et al., 2014). Fibrillarin is a core protein of the U3snoRNP and subsequently might be required to facilitate histone chaperone activity and chromatin related activities of nucleolin. Binding of the U3snoRNP complex to 5'ETS rDNA could affect the glutamine methylation state of histone H2A and consequently a functional interaction of nucleolin with the histone core. Nucleolin is able to induce remodeling of nucleosomes containing specific histone variants (see below). It is thus possible that histone modification might also affect the FACT-like activity of nucleolin. Alternatively, glutamine methylation of histone H2A could be required either for nucleolin interaction with rDNA or to induce translocation of nucleolin during transcription.

## 2.5. Nucleolin and rDNA chromatin

Early studies demonstrated that nucleolin is able to bind DNA sequences (Olson et al., 1983; Bouche et al., 1984; Sapp et al., 1986) and chromatin (Olson and Thompson, 1983) and to interact with histone H1 to induce chromatin decondensation (Erard et al., 1988; Kharrat et al., 1991). Recently, it was shown that nucleolin possesses H2A/H2B histone chaperone and chromatin related activities (Gaume et al., 2011; Goldstein et al., 2013). A functional interaction between nucleolin and rDNA chromatin was first reported using an in vitro system showing that nucleolin allows RNAPII transcription of chromatin templates (Rickards et al., 2007). This observation is linked to results demonstrating that nucleolin possesses FACT-like activity (Angelov et al., 2006) and that the FACT complex is important for chromatin transcription by RNAPII (Birch et al., 2009). Nucleolin is also able to induce remodeling by SWI/SNF of nucleosome containing the macroH2A1, but not H2ABbd histone variant (Angelov et al., 2006). Histone variant macroH2A1 is present on methylated rDNA promoter and is correlated with rRNA transcription repression. Nucleolin depletion induces nucleolar relocalization and recruitment of macroH2A1 on the rDNA (Cong et al., 2014).

Positioning of histone variant H2A.Z also seems to play a role in rDNA organization. For instance H2A.Z near the rDNA promoter is associated with rRNA gene activation in mammalian cells (Nemeth et al., 2008; van de Nobelen et al., 2010). Deposition of H2A.Z on rDNA is associated to higher transcriptional activity of rRNA gene in carp cells (Simonet et al., 2013). To our knowledge, nucleolin has not yet been implicated directly in H2A.Z positioning. However, the H2A.Z-chaperone activity of the FACT complex has been reported (Mahapatra et al., 2011). Thus, it is reasonable to propose that FACT-like activity of nucleolin might contribute to positioning or removal of H2A.Z from rDNA.

Plants do not encode macroH2A1 histone variants. However the H2A.Z histone variant seems to play a major role in controlling gene expression during plant development and in response to stress conditions (Kadonaga and Tjian, 1986; Raisner et al., 2005; Kumar and Wigge, 2010). A functional link between plant H2A.Z and nucleolin can be expected since nucleolin and rRNA gene expression profile are linked during plant development and stress conditions (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Stepinski, 2012; Durut et al., 2014).

Epigenetics plays a key role in the establishment of active and inactive rDNA chromatin. For instance, CG methylation of the rDNA and dimethylation of histone at lysine 9 (H3K9me<sub>2</sub>) and mono- and trimethylation of lysine 27 (H3K27me<sub>2</sub> and H3K27me<sub>3</sub>) are associated with transcriptionally silent genes whereas histone H3 acetylation and tri-methylation of lysine 4 (H3K4me<sub>3</sub>) is associated with active genes (Grummt and Pikaard, 2003; Pontvianne et al., 2012). Interestingly, nucleolin interacts with H3 tails and might facilitate transcription through nucleosomes (Heo et al., 2007).

Nucleolin is functionally associated with RNAPII transcription and can be linked to active epigenetic marks. Indeed, decreased amounts of nucleolin in HeLa cells induce increased H3K9me<sub>2</sub> and reduced H4K12 and H3K4me<sub>3</sub> marks in rRNA genes. Nevertheless a reduced amount of nucleolin does not affect rDNA methylation (Cong et al., 2012). Furthermore, depletion of nucleolin induces accumulation of RNAPII at the beginning of the transcribed unit and reduction of the amount of UBF along the promoter and transcribed rDNA sequences. In contrast TTF-1 binding increases with a concomitant slight accumulation of NoRC and HDAC1 factors (Cong et al., 2012). Thus, interaction of nucleolin with chromatin might block recruitment of repressive chromatin complex NoRC (Santoro and Grummt, 2005) and other activities affecting epigenetic histone marks and/or histone variant deposition/positioning.

The role of nucleolin in rDNA chromatin dynamics has also been studied in the model plant *A. thaliana* (Pontvianne et al., 2007, 2010; Durut et al., 2014). It was observed that knockout of the gene *NUC1*

induces rDNA VAR1 expression which is normally silenced in wild type plants (Pontvianne et al., 2010; Abou-Elail et al., 2011). Moreover, increased rDNA transcription is accompanied by a higher amount of RNAPII associated with the promoter and coding region. It was also observed that the 5'ETS rDNA is demethylated but histone epigenetic marks are not affected in the *nuc1* mutant plants (Pontvianne et al., 2010). Likewise, knockout of the *NUC2* gene also provokes expression of rDNA VAR1; but in contrast to *NUC1* knockout plants, the 5'ETS of rDNA is hypermethylated (Durut et al., 2014). It is not clear how *NUC1* and *NUC2* antagonistically affect rDNA methylation and expression of rDNA VAR1. Nevertheless, DNA hypomethylation in *nuc1* plants was correlated with rDNA chromatin decondensation while hypermethylation in *nuc2* plants is associated with changes in the proportion of rRNA gene variants but not rDNA decondensation. Thus nucleolin loss-function seems to trigger major changes in rDNA chromatin spatial organization, expression and trans-generational stability in plants.

Finally, it was shown that both *NUC1* and *NUC2* bind chromatin. However only *NUC1* is able to assist remodeling of nucleosome in vitro (Durut et al., 2014). Because of the antagonistic activities of *NUC1* and *NUC2*, it would be reasonable to speculate that *NUC1* and *NUC2* interact with rDNA and might inhibit/facilitate the recruitment of activator or repressor chromatin remodeling complexes. To our knowledge, NoRC or CSB/CSA (Yuan et al., 2007; Koch et al., 2014) that negatively or positively controls rRNA gene expression in animals has not been reported in plants. Thus many questions remain open concerning the impact of *NUC1* and *NUC2* on rDNA chromatin dynamics and interactions with specific histone variants and chromatin remodeler complexes.

## 3. Final conclusion

Eukaryotic cells contain hundreds or thousands of copies of 45S rRNA genes localized in Nucleolus Organizer Regions (NORs). However, only a small proportion of these genes is transcriptionally active or competent for RNAPII transcription. Nucleolin protein is associated with active genes and required for rRNA transcription. However, the molecular mechanisms directing the functional interaction of nucleolin with rDNA chromatin competent for transcription are not yet fully understood.

Transcriptionally competent rRNA genes switching from ON to OFF states depend on cellular conditions. Controlling nucleolin gene expression (and/or modifications) and association with rDNA chromatin is expected to play a role in recruitment of chromatin remodeler activities that might activate or repress RNAPII transcription. Plant and mammalian nucleolins seem to affect rDNA chromatin organization in different ways, either at the DNA methylation level or by modifying histone methylation marks respectively. Thus, it would be important to investigate mutual dependency and/or crosstalk between nucleolin and DNA/histone modification pathways (Fig. 2).

Furthermore, it is important to note that transcription of rDNA is linked to pre-rRNA processing. In other words, changes in pre-rRNA processing could affect rDNA transcription. On chromatin, nucleolin might “point to” transcriptionally active genes and/or assist RNAPII transcription, whereas interaction of nucleolin with pre-rRNA might be required for suitable RNA folding and/or processing. Accordingly, it is difficult to conclude on a hierarchical impact of nucleolin in rDNA chromatin organization and processing of rRNA in vivo. A substantial effort should be engaged to address this long standing question.

Finally, it is significant to recall that a single nucleolin protein controls rDNA expression in mammalian and yeast cells while two distinct nucleolin proteins with antagonistic activities seem to be implicated in plants. Plants are sessile organisms and the second gene may be a novel mode of nucleolin to control rRNA gene expression under specific plant developmental and environmental conditions. Determining their role in establishing and/or maintaining active or silent rDNA chromatin is the next challenge.

## Acknowledgment

We thank F. Pontvianne for critical reading and R. Cooke for corrections of English. We apologize to our colleagues whose work we did not mention in this review. This work was supported by the CNRS and by a grant ANR SVSE2\_SUBCELIF 087217.

## References

- Abdelmohsen, K., Gorospe, M., 2012. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808.
- Abou-Elail, M., Cooke, R., Saez-Vasquez, J., 2011. Variations in a team: major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* 2.
- Albert, A.C., Denton, M., Kermekchiev, M., Pikaard, C.S., 1999. Histone acetyltransferase and protein kinase activities copurify with a putative *Xenopus* RNA polymerase I holoenzyme self-sufficient for promoter-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 796–806.
- Allain, F.H., Bouvet, P., Dieckmann, T., Feigon, J., 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J.* 19, 6870–6881.
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera, M.I., 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 152–158.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Miettinen, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., Bouvet, P., 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* 25, 1669–1679 (Epub 2006 Apr 1666).
- Barneche, F., Steinmetz, F., Echeverria, M., 2000. Fibrillar genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 275, 27212–27220.
- Bharti, A.K., Olson, M.O., Kufe, D.W., Rubin, E.H., 1996. Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 271, 1993–1997.
- Birch, J.L., Tan, B.C., Panov, K.I., Panova, T.B., Andersen, J.S., Owen-Hughes, T.A., Russell, J., Lee, S.C., Zomerjijk, J.C., 2009. FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. *EMBO J.* 28, 854–865.
- Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D.T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E., Hirt, H., 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucM1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* 8, 417–428.
- Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., 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.
- Bourbon, H.M., Lapeyre, B., Amalric, F., 1988. Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *J. Mol. Biol.* 200, 627–638.
- Caparros-Ruiz, D., Lahmy, S., Piersanti, S., 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.
- Carpentier, M., Morelle, W., Coddeville, B., Pons, A., Masson, M., Mazurier, J., Legrand, D., 2005. Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 44, 5804–5815.
- Cerddido, A., Medina, F.J., 1995. Subnucleolar location of fibrillar and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 103, 625–634.
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., Bouvet, P., 2014. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 181–192.
- Cong, R., Das, S., Douet, J., Wong, J., Buschbeck, M., Mongelard, F., Bouvet, P., 2014. MacroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 181–192.
- Das, S., Cong, R., Shandilya, J., Senapati, P., Moindrot, B., Monier, K., Delage, H., Mongelard, F., Kumar, S., Kundu, T.K., Bouvet, P., 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Lett.* 587, 417–424.
- de Carcer, G., Medina, F.J., 1999. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J. Struct. Biol.* 128, 139–151.
- Durut, N., Abou-Elail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., de Bures, A., Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., Merret, R., Echeverria, M., Bouvet, P., Nakamura, K., Saez-Vasquez, J., 2014. A duplicated NUCLEOLIN gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 1330–1344.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., Pikaard, C.S., 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* 24, 1119–1132.
- Edwards, T.K., Saleem, A., Shaman, J.A., Dennis, T., Gerigk, C., Oliveros, E., Gartenberg, M.R., Rubin, E.H., 2000. Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 275, 36181–36188.
- Egyhazi, E., Pigon, A., Chang, J.H., Ghaffari, S.H., Dreesen, T.D., Wellman, S.E., Case, S. T., Olson, M.O., 1988. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus salivary gland cells*. *Exp. Cell Res.* 178, 264–272.
- Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., Amalric, F., 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* 175, 525–530.
- Escande, M.L., Gas, N., Stevens, B.J., 1985. Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biol. Cell.* 53, 99–109.
- Fernandez-Gomez, M.E., Sanchez-Pina, M.A., Risueno, M.C., Medina, F.J., 1983. Differential staining of the nucleolar organizing region (NOR) and nucleolar components by a new silver technique in plants. *Cell. Mol. Biol.* 29, 181–187.
- Gabellini, D., Green, M.R., Tupler, R., 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110, 339–348.
- Gaume, X., Monier, K., Argoul, F., Mongelard, F., Bouvet, P., 2011. In vivo study of the histone chaperone activity of nucleolin by FRAP. *Biochem. Res. Int.* 2011, 187624.
- Ginisty, H., Amalric, F., Bouvet, P., 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 17, 1476–1486.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P., 1999. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112, 761–772.
- Ginisty, H., Serin, G., Ghisolfi-Nieto, L., Roger, B., Libante, V., Amalric, F., Bouvet, P., 2000. Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. *J. Biol. Chem.* 275, 18845–18850.
- Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., Kastan, M.B., 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16874–16879.
- Gonzalez-Camacho, F., Medina, F.J., 2006. 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 (Epub 2005 Oct 2011).
- Goodpasture, C., Bloom, S.E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53, 37–50.
- Granneman, S., Baserga, S.J., 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 281–286.
- Grummt, I., 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* 17, 1691–1702.
- Grummt, I., Pikaard, C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 641–649.
- Gullii, M.P., Girard, J.P., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., 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.
- Haasen, D., Kohler, C., Neuhaus, G., Merkle, T., 1999. Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 695–705.
- Heo, K., Kim, B., Kim, K., Choi, J., Kim, H., Zhan, Y., Ranish, J.A., An, W., 2007. Isolation and characterization of proteins associated with histone H3 tails in vivo. *J. Biol. Chem.* 282, 15476–15483.
- Hernandez-Verdun, D., Derenzini, M., Bouteille, M., 1982. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. *Chromosoma* 85, 461–473.
- Kadonaga, J.T., Tjian, R., 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5889–5893.
- Kharrat, A., Derancourt, J., Doree, M., Amalric, F., Erard, M., 1991. Synergistic effect of histone H1 and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer. *Biochemistry* 30, 10329–10336.
- Koch, S., Garcia Gonzalez, O., Assfalg, R., Schelling, A., Schafer, P., Scharffetter-Kochanek, K., Iben, S., 2014. Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. *Cell Cycle* 13, 2029–2037.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Tabata, S., Saez-Vasquez, J., Echeverria, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S., Nakamura, K., 2007. Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* 49, 1053–1063.
- Kondo, K., Inouye, M., 1992. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267, 16252–16258.
- Kumar, S.V., Wigge, P.A., 2010. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* 140, 136–147.
- Lacadena, J.R., Cermeno, M.C., Orellana, J., Santos, J.L., 1984. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67, 207–213.
- Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S.H., Rao, S.V., Dumar, T.S., Olson, M.O., 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J. Biol. Chem.* 261, 9167–9173.
- Lee, W.C., Zabetakis, D., 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., Gullii, M.P., Noaillac-Depeyre, J., Faubladiere, M., Sicard, H., Caizergues-Ferrer, M., 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.
- Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S., Fukui, K., 2007. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.* 120, 2091–2105.
- Mahapatra, S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A., Bhargava, P., 2011. Yeast H2A.Z, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 4023–4034.
- Messmer, B., Dreyer, C., 1993. Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 369–382.

- Nemeth, A., Guibert, S., Tiwari, V.K., Ohlsson, R., Langst, G., 2008. Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *EMBO J.* 27, 1255–1265.
- Olson, M.O., Thompson, B.A., 1983. Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* 22, 3187–3193.
- Olson, M.O., Rivers, Z.M., Thompson, B.A., Kao, W.Y., Case, S.T., 1983. Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 3345–3351.
- Orrick, L.R., Olson, M.O., Busch, H., 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1316–1320.
- Pellar, G.J., DiMario, P.J., 2003. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* 111, 461–469 (Epub 2003 Feb 2026).
- Petricka, J.J., Nelson, T.M., 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* 144, 173–186.
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., Saez-Vasquez, J., 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* 18, 369–379.
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S., Saez-Vasquez, J., 2010. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 6, e1001225.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Feng, W., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., Pikaard, C.S., 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev.* 26, 945–957.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Pichard, E., Bachellerie, J.P., Puvion, E., 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 149–162.
- Quezada, C., Navarro, C., San Martin, R., Alvarez, M., Molina, A., Vera, M.I., 2006. Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: evidence for several genes. *Biol. Res.* 39, 353–365.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., Madhani, H.D., 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233–248.
- Raska, I., 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13, 517–525.
- Reichler, S.A., Balk, J., Brown, M.E., Woodruff, K., Clark, G.B., Roux, S.J., 2001. Light differentially regulates cell division and the mRNA abundance of pea nucleolin during deetiolation. *Plant Physiol.* 125, 339–350.
- Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., LeRoy, G., 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell Biol.* 27, 937–948.
- Roger, B., Moisan, A., Amalric, F., 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 (Epub 12001 Dec 10231).
- Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F., Hernandez-Verdun, D., 1992. Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp. Cell Res.* 203, 259–269.
- Saez-Vasquez, J., Medina, F.J., 2008. The plant nucleolus. *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology* vol. 47. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, pp. 1–46.
- Saez-Vasquez, J., Meissner, M., Pikaard, C.S., 2001. RNA polymerase I holoenzyme–promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 47, 449–459.
- Saez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., Echeverria, M., 2004a. 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., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., Echeverria, M., 2004b. Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 578–580.
- Samaha, H., Delorme, V., Pontvianne, F., Cooke, R., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Echeverria, M., Saez-Vasquez, J., 2010. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a *Brassica oleracea* RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant J.* 61, 383–398.
- Sanij, E., Poortinga, G., Sharkey, K., Hung, S., Holloway, T.P., Quin, J., Robb, E., Wong, L.H., Thomas, W.G., Stefanovsky, V., Moss, T., Rothblum, L., Hannan, K.M., McArthur, G.A., Pearson, R.B., Hannan, R.D., 2008. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J. Cell Biol.* 183, 1259–1274.
- Santoró, R., 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.
- Sapp, M., Knippers, R., Richter, A., 1986. DNA binding properties of a 110 kDa nucleolar protein. *Nucleic Acids Res.* 14, 6803–6820.
- Simonet, N.G., Reyes, M., Nardocci, G., Molina, A., Alvarez, M., 2013. Epigenetic regulation of the ribosomal cistron seasonally modulates enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in response to different environmental inputs in carp (*Cyprinus carpio*). *Epigenet. Chromatin* 6, 22.
- Srivastava, M., Pollard, H.B., 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911–1922.
- Stepinski, D., 2009. Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* 235, 77–89.
- Stepinski, D., 2012. Nucleolin level in plant root meristematic cells under chilling stress and recovery. *Micron* 43, 870–875.
- Storck, S., Shukla, M., Dimitrov, S., Bouvet, P., 2007. Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell. Biochem.* 41, 125–144.
- Storck, S., Thiry, M., Bouvet, P., 2009. Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol. Cell.* 101, 153–167.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., Tuteja, N., 2011. Nucleolin: the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* 4, 267–275.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., Kouzarides, T., 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.
- Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.L., McStay, B., Watkins, N.J., 2009. A novel SSU processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5 and DBP4. *Mol. Cell Biol.* 30, 30.
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., Bouvet, P., 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8, 66.
- van de Nobelen, S., Rosa-Garrido, M., Leers, J., Heath, H., Soochit, W., Joosen, L., Jonkers, I., Demmers, J., van der Reijden, M., Torrano, V., Grosveld, F., Delgado, M.D., Renkawitz, R., Galjart, N., Sleutels, F., 2010. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenet. Chromatin* 3, 19.
- Villa-Hernandez, J.M., Dinkova, T.D., Aguilar-Caballero, R., Rivera-Cabrera, F., Sanchez de Jimenez, E., Perez-Flores, L.J., 2013. Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie* 95, 1871–1879.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H.J., Schutz, G., Grummt, I., 2005. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 19, 77–87.
- Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., Zhou, Y., 2007. Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol. Cell* 27, 585–595.
- Zhang, L., Hu, Y., Yan, S., Li, H., He, S., Huang, M., Li, L., 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Mol. Biol.* 79, 285–293.



# Résultats

---

## **Partie I : Implication de la protéine NUC2 dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr 45S chez *A. thaliana*.**

---

Cette première partie est dédiée à la caractérisation fonctionnelle de la protéine NUC2. Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le gène dupliqué *NUC2* est un gène fonctionnel impliqué dans l'organisation des gènes d'ARNr.

Dans un premier temps, nous avons montré que la mutation du gène *NUC2*, par insertion ADN-T, n'affecte pas les premières étapes du développement de la plante, contrairement à son homologue *NUC1*. Seul un léger retard de floraison est observé. En revanche, la double mutation *nuc1nuc2* est létale ce qui souligne l'importance de ces deux protéines pour la survie de la plante.

Par la suite, l'étude des plantes mutantes *nuc2* nous a permis de montrer que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation et l'expression des gènes d'ARNr, mais par des mécanismes antagonistes à ceux décrits pour la NUC1. Les mutants *nuc1* et *nuc2* présentent une accumulation des transcrits *VAR1*, normalement réprimés dans les plantes sauvages adultes. Cependant, contrairement au mutant *nuc1*, l'absence de la NUC2 induit une hyper méthylation des ADNr associée à des variations du nombre de copies des variants d'ADNr suggérant que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation génomique des gènes d'ARNr et donc dans la stabilité du génome. L'ensemble de ces travaux nous ont permis d'établir un modèle dans lequel nous proposons que la protéine NUC2 participe à la formation de l'hétérochromatine dans les premières étapes de développement de la plante.

# A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in *Arabidopsis*<sup>C|W|O|P|E|N</sup>

Nathalie Durut,<sup>a,b</sup> Mohamed Abou-Ellail,<sup>a,b</sup> Frédéric Pontvianne,<sup>a,b</sup> Sadhan Das,<sup>c</sup> Hisae Kojima,<sup>d</sup> Seiko Ukai,<sup>d</sup> Anne de Bures,<sup>a,b</sup> Pascale Comella,<sup>a,b</sup> Sabine Nidelet,<sup>e</sup> Stéphanie Rialle,<sup>e</sup> Remy Merret,<sup>a,b</sup> Manuel Echeverria,<sup>a,b</sup> Philippe Bouvet,<sup>c</sup> Kenzo Nakamura,<sup>d,1</sup> and Julio Sáez-Vásquez<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5096, 66860 Perpignan, France

<sup>b</sup> Université de Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5096, F-66860 Perpignan, France

<sup>c</sup> École Normale Supérieure Lyon, CNRS, Unité de Service et de Recherche 3010, Lyon 69364, France

<sup>d</sup> Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

<sup>e</sup> Montpellier GenomiX, Montpellier Cedex 5, France

ORCID ID: 0000-0002-2717-7995 (J.S.-V.)

**In plants as well as in animals, hundreds to thousands of 45S rRNA gene copies localize in Nucleolus Organizer Regions (NORs), and the activation or repression of specific sets of rDNA depends on epigenetic mechanisms. Previously, we reported that the *Arabidopsis thaliana* nucleolin protein NUC1, an abundant and evolutionarily conserved nucleolar protein in eukaryotic organisms, is required for maintaining DNA methylation levels and for controlling the expression of specific rDNA variants in *Arabidopsis*. Interestingly, in contrast with animal or yeast cells, plants contain a second nucleolin gene. Here, we report that *Arabidopsis* NUC1 and NUC2 nucleolin genes are both required for plant growth and survival and that NUC2 disruption represses flowering. However, these genes seem to be functionally antagonistic. In contrast with NUC1, disruption of NUC2 induces CG hypermethylation of rDNA and NOR association with the nucleolus. Moreover, NUC2 loss of function triggers major changes in rDNA spatial organization, expression, and transgenerational stability. Our analyses indicate that silencing of specific rRNA genes is mostly determined by the active or repressed state of the NORs and that nucleolin proteins play a key role in the developmental control of this process.**

## INTRODUCTION

In eukaryotes, 45S rDNA (encoding 18S, 5.8S, and 25S rRNA) is arranged in tandem arrays, with copy numbers ranging from hundreds to several thousands in plants. However, only a small proportion of rRNA genes are transcribed. The active fraction forms loops that emanate from knobs of heterochromatin to form the nucleolus (Sáez-Vásquez and Gadal, 2010; Layat et al., 2012; Grummt and Längst, 2013). Although the epigenetic pathways to silence rDNA have largely been studied in *Arabidopsis thaliana* hybrid plants (Lawrence et al., 2004), the mechanisms that activate and/or repress hundreds of rDNA units have not yet been fully elucidated in a nonhybrid plant. Recent reports reveal that proteins involved in histone and DNA modifications might play major roles in the activation and/or

repression of specific subsets of rRNA genes in *Arabidopsis* plants (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2012).

Nucleolin is one of the most abundant nucleolar proteins and is expected to play a major role in the multiple functions of the nucleolus. Moreover, it has been implicated in DNA replication, recombination, and repair (Tuteja and Tuteja, 1998), nucleolar localization of telomerase (Khurts et al., 2004), and chromatin remodeling (Angelov et al., 2006; Mongelard and Bouvet, 2007). However, in contrast with animals and yeast, the genomes of different plant species encode at least two nucleolin-like proteins (Supplemental Figure 1). This suggests that duplicated nucleolin genes might play redundant and/or specific roles during plant growth and development or in response to environmental conditions.

In *Arabidopsis*, two genes encoding nucleolin proteins have been described: NUC1 and NUC2 (formerly named NUC-L1 and NUC-L2). The first is highly and ubiquitously expressed in normal growth conditions (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Knockout mutations of the gene are not lethal but lead to severe defects in plant growth and development (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Moreover, the absence of this protein in *nuc1* (formally named *nuc-L1*) mutant plants induces nucleolar disorganization, Nucleolus Organizer Region (NOR) decondensation, pre-rRNA accumulation (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007), and the derepression of specific 45S

<sup>1</sup> Current address: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

<sup>2</sup> Address correspondence to saez@univ-perp.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Julio Sáez-Vásquez (saez@univ-perp.fr).

Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

Online version contains Web-only data.

Articles can be viewed online without a subscription.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.114.123893

rDNA variants (Kojima et al., 2007; Pontvianne et al., 2010). By contrast, little is known about NUC2 and its role in rDNA chromatin organization and expression. This led us to investigate more precisely the biological significance of the second nucleolin gene in *Arabidopsis*. We report here that *Arabidopsis* plants require the expression of both *NUC1* and *NUC2* for survival. *NUC1* and *NUC2* both bind chromatin and control rDNA variant expression, but they act through different and antagonistic molecular mechanisms. In *nuc2* loss-of-function plants, rRNA genes are globally hypermethylated, and the copy number of rDNA variants is affected. Finally, the data suggest that delocalization of silent 45S rDNA from inactive to active NORs is able to induce transcriptional activation of normally repressed rRNA genes.

## RESULTS

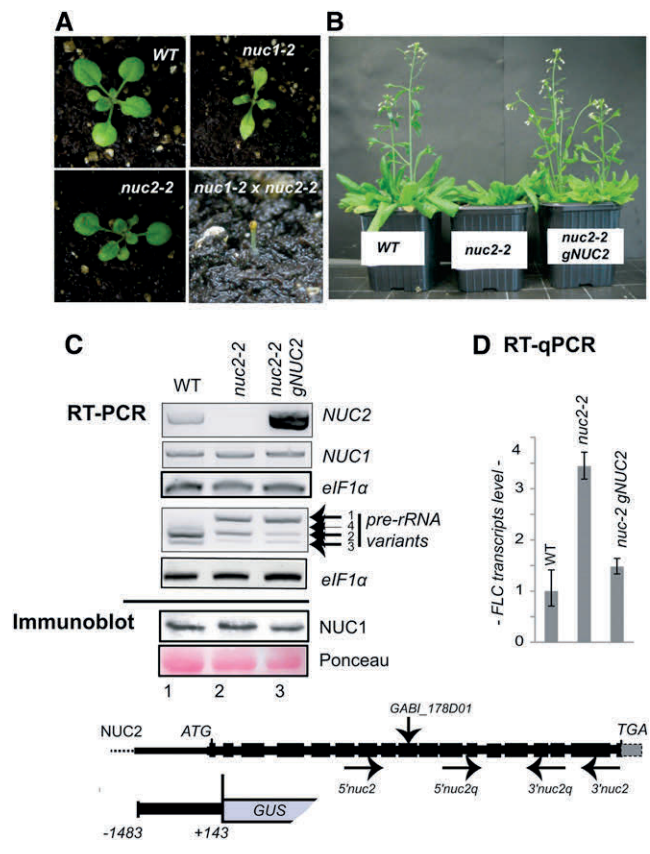
### *NUC2* Is a Functional Protein-Coding Gene

To address the role and biological significance of the second nucleolin gene in plants, we characterized two homozygous *nuc2* mutant lines, inducing partial (*nuc2-1*) or complete (*nuc2-2*) loss of *NUC2* gene expression (Figure 1; Supplemental Figure 2).

Under long-day conditions (16-h day/8-h night), *nuc2-2* mutant seedlings emerge and grow quite similarly to wild-type plants (Figure 1A), while *nuc1* plants display growth defects (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010). We further observed that *nuc1 nuc2* double mutants are not viable (Figure 1A). Indeed, homozygous *nuc1* and *nuc2-2* double mutations are seedling lethal, indicating that *NUC2* is a functional gene and that both nucleolin genes are required for plant survival. Similar results were obtained when the allele *nuc1-3* was introduced into *nuc2-1* mutant plants. We also observed that *nuc1* mutant plants heterozygous for *NUC2* are viable but display stronger growth and developmental defects than homozygous *nuc1* or *nuc2* single mutant plants (Supplemental Figure 3).

Interestingly, *nuc2-2* mutants flower later than wild-type plants (Figure 1B). After 53 d of growth, the wild type displays ~17 flowers per plant, in contrast with ~1 flower per plant for *nuc2-2*. The number of rosette leaves at the time of bolting is ~10 and ~20 in wild-type and *nuc2-2* plants, respectively. We do not observe any obvious floral and/or silique phenotype in *nuc2-2* plants. Late flowering is related to the disruption of the *NUC2* gene, since complementation of *nuc2-2* plants with the *Arabidopsis NUC2* genomic sequence restores wild-type flowering time (Figures 1B and 1C). Moreover, quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses reveal a higher accumulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* transcripts in *nuc2-2* than in wild-type plants (Figure 1D), which is restored in *nuc2-2* plants carrying the *gNUC2* transgene. These observations are further supported by RNA sequencing analysis showing that *FLC* is upregulated in the *nuc2-2* plants. No other genes related to flowering timing or development were detected among the 33 upregulated or 17 downregulated genes in *nuc2-2* compared with wild-type plants (Supplemental Figure 4).

The *Arabidopsis* genome encodes at least four variants of 45S rDNA. While rDNA VAR1 copies are globally transcriptionally



**Figure 1.** *Arabidopsis NUC2* Is a Functional Protein Gene.

**(A)** Photographs of *Arabidopsis* wild-type, *nuc2-2* (GABI\_178D01), *nuc1-2* (SALK\_002764), and *nuc1 nuc2* plants.

**(B)** *Arabidopsis* wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants were grown on soil under a 16-h/8-h light/dark cycle. Late flowering is observed in *nuc2-2* mutants compared with wild-type and *nuc2-2 gNUC2* plants.

**(C)** Top panel, RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old wild-type (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), and *nuc2-2 gNUC2* (lane 3) seedlings to detect *NUC2*, *NUC1*, and 3' ETS pre-rRNA transcripts, respectively. Amplification of *eIF1α* transcripts was performed to verify similar amounts of cDNA in each sample. Bottom panel, immunoblot reaction using  $\alpha$ -At-*NUC1*. The membrane was stained with Ponceau S before hybridization to verify similar amounts of proteins.

**(D)** RT-qPCR analysis to determine relative levels of *FLC* transcripts in wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants. The drawing at bottom shows the *Arabidopsis NUC2* gene from the ATG start codon to the TGA stop codon. Black boxes correspond to exons separated by introns. The positions of primers 5'*nuc2*/3'*nuc2* and 5'*nuc2q*/3'*nuc2q* used in RT-PCR experiments are shown. A sequence upstream from ATG (nucleotide 1483), the first intron, and the exon from the *NUC2* gene fused to GUS are represented. The positions of primers 5'*nuc1*/3'*nuc1* and rRNA 5'*3ets*/3'*3ets* are shown in Figure 4 and Supplemental Figure 3. The T-DNA insertion in the *nuc2-2* mutant plant GABI\_178D01 is indicated.

[See online article for color version of this figure.]

inactive, rDNA VAR2, VAR3, and VAR4 units are permissive to transcription in adult plants (Pontvianne et al., 2010; Abou-Elail et al., 2011). Disruption of the *NUC1* gene induces the derepression of rDNA VAR1 copies (Pontvianne et al., 2010). Interestingly, strong accumulation of pre-rRNA VAR1 and a decrease of pre-rRNA VAR2 and VAR3 levels are observed in *nuc2-2* mutant

plants (Figure 1C). Wild-type profiles of VAR1 and VAR2 pre-rRNA are not restored to the wild-type level in the *nuc2-2* plants complemented with the *gNUC2* construct. By contrast, we do not detect major differences between the level of *NUC1* transcripts or protein in *nuc2-2* or *nuc2-2 gNUC2* plants compared with wild-type plants.

Thus, the results described above show that *NUC2* is a functional gene that influences flowering time and rRNA gene expression, two phenotypes that appear to be uncoupled.

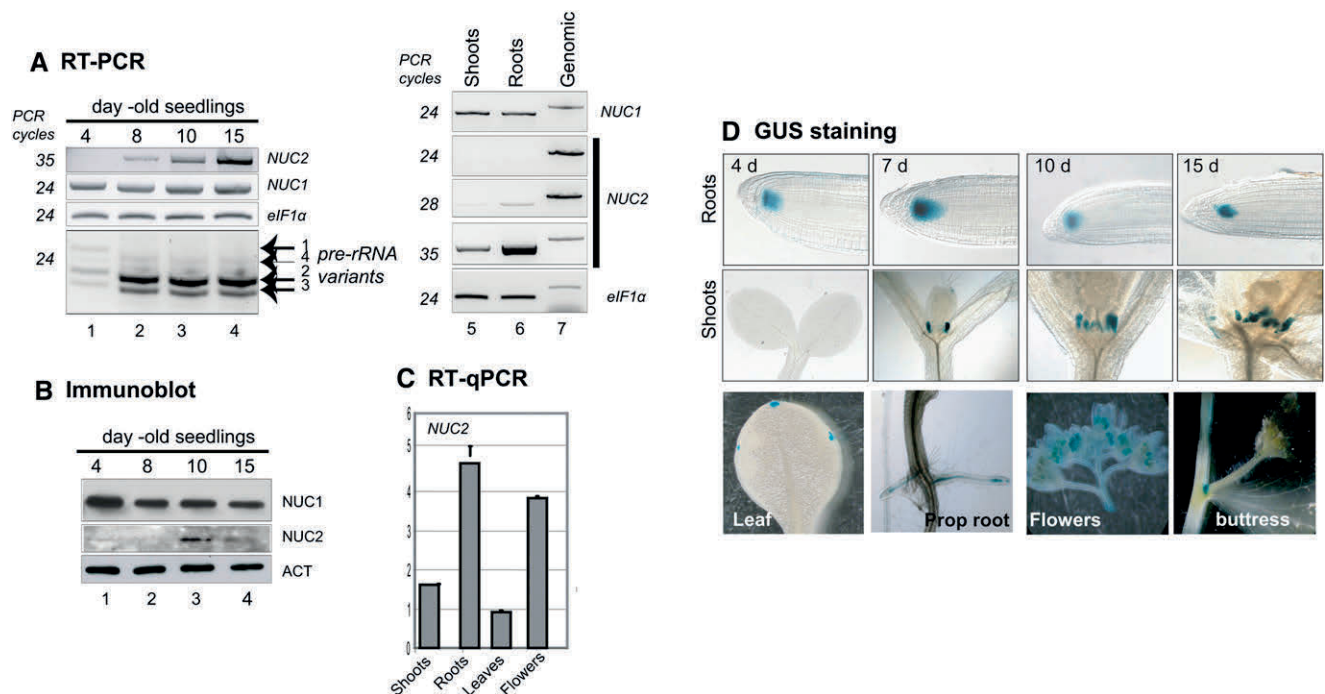
### ***NUC2* Promoter Activity in Specific Plant Tissues and Organs**

Database analyses using Genevestigator ([www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/)) and BAR ([www.bar.utoronto.ca/welcome.htm](http://www.bar.utoronto.ca/welcome.htm)) allow the identification of major fluctuations in the levels of *NUC2* transcripts among different plant tissues, organs, developmental stages, and/or environmental conditions (Figure 2; Supplemental Figure 5). RT-PCR analyses confirm that *NUC2* transcripts are detectable 8 d after germination and then accumulate at 10 and 15 d. A peak of *NUC2* protein accumulation is also detected at 10 d. Interestingly, a concomitant decrease of the pre-rRNA VAR1 level is observed 8 d after germination. By contrast, the levels of

*NUC1* transcript and protein remain similar from 4 to 15 d after germination and accumulate at similar levels in both roots and shoots (Figures 2A and 2B). In adult plants, we observed that the *NUC2* transcript level is higher in roots and flowers than in shoots and leaves (Figures 2A and 2C).

To gain insight into the developmental control of *NUC2* gene expression, we further characterized *NUC2* promoter activity using plants bearing *pNUC2:GUS* (for  $\beta$ -glucuronidase) transcriptional fusions. In the root apical meristem, GUS staining is detected at 4, 7, 10, and 15 d after germination (Figure 2D, top row). By contrast, staining is detected in stipules only after 7 d of germination and then at 10 and 15 d (Figure 2D, middle row), in agreement with our RT-PCR analyses. In adult plants, expression is detected specifically in leaf hydathode cells, lateral roots, flowers, and the buttress (Figure 2D, bottom row). On the other hand, *NUC2* promoter activity is induced in response to auxin treatment and during silique development, earlier in developing anthers than in developing pistils (Supplemental Figures 6 and 7).

Accordingly, these results show that *NUC2* is developmentally controlled in most plant tissues and organs analyzed. Importantly, *NUC2* expression and protein abundance increase during the establishment of rDNA VAR1 repression throughout seedling development.



**Figure 2.** *NUC2* Gene Expression during Seedling Development and in Plant Organs.

**(A)** RT-PCR to show *NUC2* and *NUC1* transcripts during seed germination (lanes 1 to 4), in shoots (lane 5), and in roots (lane 6). Absence of genomic contamination in the cDNA samples was verified by amplification of *NUC1*, *NUC2*, and *eIF1α* genomic DNA, which generates higher molecular size bands (lane 7). The number of cycles (24, 28, and 35) of each PCR is indicated.

**(B)** Immunoblot experiment to determine the levels of *NUC1* and *NUC2* proteins during seed germination.  $\alpha$ -Actin (ACT) was used to verify similar amounts of proteins.

**(C)** RT-qPCR to determine the relative levels of *NUC2* transcripts in shoots, roots, leaves, and flowers.

**(D)** Analysis of *NUC2* promoter activity in *Arabidopsis* plants transformed with the *pAtNUC2:GUS* construct. Top and middle rows, *Arabidopsis* seeds were sown on MS medium and maintained for 48 h at 4°C (day 0) and then transferred to room culture, at 22°C under continuous light conditions, for 4, 7, 10, and 15 d. Bottom row, GUS staining in leaf hydathode cells, roots, flowers, and buttress. The *NUC2* gene fused to GUS is represented in Figure 1.

### NUC1 Protein Might Control NUC2 Expression

Disruption of *NUC1* induces *NUC2* overexpression (Pontvianne et al., 2007, 2010). To determine if *NUC1* might control *NUC2* expression at the transcriptional level, we transformed *nuc1* mutant plants with the *pNUC2:GUS* reporter gene construct. As shown in Figure 3A, the *nuc1* mutation considerably strengthens the *pNUC2:GUS* signal and extends *NUC2* promoter activity to the entire seedling (compare with Figure 2D, staining in the stipules and roots). In fact, the *pNUC2:GUS* signal in the *nuc1* background is similar to the *pNUC1:GUS* signal in wild-type plants (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). Next, the possibility that *NUC1* protein physically interacts with chromatin at the *NUC2* locus was tested by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using an anti-*NUC1* serum (Figure 3B). In wild-type chromatin, *NUC2* sequences were detected with primer pairs corresponding to the 5' region (lanes 5 and 8) but not with primers matching the upstream intergenic region (lane 2). The 5' end of *NUC2* transcripts maps to the position -87 nucleotides upstream from the ATG translation initiation codon; therefore, *NUC1* likely binds the *NUC2* promoter domain rather than its 5' untranslated region domain. No significant signals were detected in PCR using chromatin incubated with protein A alone (lanes 1, 4, and 7) or using chromatin extracted from *nuc1-2* seedlings and incubated with antibodies against *NUC1* (lanes 1, 2, 4, 5, 7, and 8). These *in vivo* analyses are corroborated by *in vitro* electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing that *NUC1* recombinant protein can bind different regions of *NUC2* promoter DNA indiscriminately. These observations suggest that the specificity of *NUC1* for region -307 to -38 might be conferred by the *NUC2* promoter chromatin structure or by other associated proteins in planta (Supplemental Figure 8A).

In standard growth conditions, a methylation island is detected at the 3' sequence of the *NUC2* gene (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/methylome>). However, no changes of CG methylation are observed in this region or in the promoter sequence in *nuc1* mutants (Supplemental Figure 8B). Nevertheless, *NUC2* is also overexpressed in *met1* mutant plants that exhibit a massive loss of DNA methylation at the 3' sequence (Figure 3C). Therefore, local changes in DNA methylation levels cannot explain *NUC2* overexpression in *nuc1* plants. In addition, analyses of mutants for the RNA-directed DNA methylation pathway and histone deacetylases/acetylases do not reveal changes in the expression of *NUC2* (Supplemental Figure 8C).

To test if *NUC1* might also influence *NUC2* expression at the posttranscriptional level, we measured *NUC2* protein levels in 15-d-old wild-type and mutant plants (Figure 3D). At this stage, *NUC2* protein is detected in the two *nuc1* mutant lines tested (lanes 1 and 2) but not in wild-type (lane 6), *nuc2-2* (lane 3), *nuc2-2 gNUC2* (lane 4), or *met1* (lane 5) plants. Furthermore, overexpression of the *NUC2* gene, under the control of the *NUC1* promoter, does not lead to the accumulation of *NUC2* protein in wild-type plants (data not shown).

Together, these results indicate that *NUC1* is required to inhibit *NUC2* gene expression at the transcriptional level and may also influence the accumulation of *NUC2* protein.

### NUC2 Gene Disruption Affects rDNA Chromatin Organization

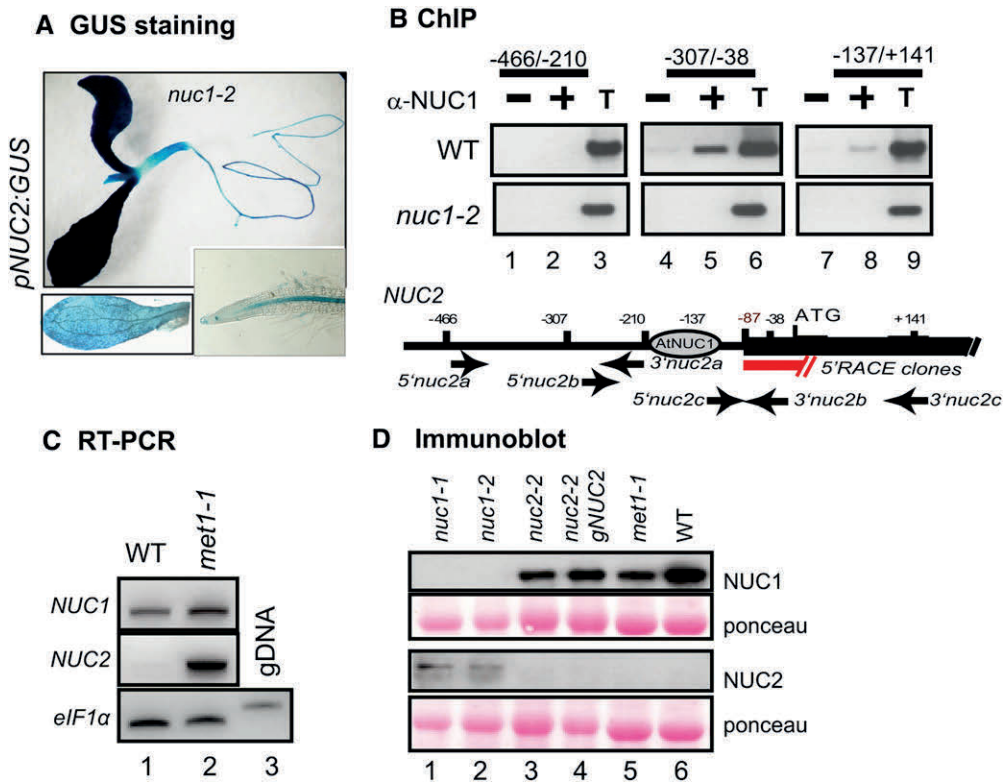
Because *NUC2* gene disruption increases VAR1 rDNA expression, we further questioned whether (1) RNA pol I transcription and/or (2) rDNA chromatin states are affected in *nuc2-2* mutant plants. In *nuc1* and *histone deacetylase6 (hda6)* mutant plants, the expression of pre-rRNA VAR1 is associated with rRNA transcription initiated from an intergenic spacer and with rDNA chromatin decondensation (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010).

Primer extension analysis (Figure 4A) shows that a single transcription initiation signal (TIS) is detected in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* samples (lanes 2 and 3), in contrast with the double TIS observed in wild-type plants (lane 1). Nevertheless, quantification of the ratio between the TIS corresponding to primary pre-rRNA and the P signal corresponding to short-lived 5' end-cleaved pre-rRNA does not reveal significant changes in the amount of primary or processed rRNA precursors in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* compared with wild-type samples.

To assess whether *NUC2* might influence the expression and subnuclear localization of rDNA, we first tested whether *NUC2* associates with a chromatin fraction. Chromatin samples were notably purified from *nuc1* mutant plants, in which *NUC2* protein overaccumulates, and analyzed by immunoblot. *NUC2* protein was detected in *nuc1* but not in wild-type chromatin samples (Figure 4B). Similarly, the accumulation of *NUC1* protein was detected in wild-type but not in *nuc1* mutant extracts. Based on these results, *NUC2* subnuclear localization was analyzed in more detail by immunofluorescence on fixed cells. This reveals a discrete localization in the nucleolus near large heterochromatin regions corresponding to heavily 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained DNA in the *nuc1* mutant background (Figure 4C; Supplemental Figure 9C). Interestingly, therefore, *NUC2* is mainly concentrated in nucleolar regions physically associated with condensed chromatin regions from which VAR1 rDNA has recently been shown to emanate (Pontvianne et al., 2013). Furthermore, the nucleolar localization of *NUC1* protein is not affected in *nuc2-2* plants (Supplemental Figure 10).

DNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of leaf cells shows that up to four rDNA signals are detected in interphase nuclei of wild-type plants (Figure 4D; Supplemental Table 1). These signals correspond to two each of NOR2 and NOR4 (in chromosomes 2 and 4, respectively), as expected in a diploid *Arabidopsis* cell (Pecinka et al., 2004). Interestingly, ~18% of nucleoli from *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* cells associate with three or more rDNA signals compared with one or two rDNA signals in wild-type nucleoli. By contrast, no significant differences can be detected in the number or size of the centromeres between the DAPI-labeled wild-type and *nuc2-2* and/or *nuc2-2 gNUC2* plants.

Finally, to obtain more insight into how disruption of *NUC2* induces the transcriptional activation of repressed rDNA VAR1, we purified nucleoli from *nuc2-2* mutant plants by fluorescence-assisted nucleolus sorting (FANoS) (Pontvianne et al., 2013). The four rDNA variants are detected in the nuclear fraction from wild-type and *nuc2-2* plants (Figure 4E, lanes 1 and 3). By contrast, in the nucleolar fraction, VAR1 rDNA is enriched in *nuc2-2* samples (lane 4), while only a faint band is detected in wild-type plants (lane 2).



**Figure 3.** NUC1 Participates in the Regulation of *NUC2* Gene Expression.

**(A)** Analysis of *NUC2* promoter activity in *nuc1* mutant plants transformed with the *pNUC2:GUS* construct. The bottom panels show shorter staining to better visualize GUS activity in leaves and roots.

**(B)** Chromatin from wild-type plants was isolated and incubated either with protein A only (lanes 1, 4, and 7) or with antibodies against NUC1 (lanes 2, 5, and 8). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR to detect *NUC2* sequences from  $-466$  to  $-210$  (lanes 1 to 3), from  $-307$  to  $-38$  (lanes 4 to 6), and from  $-137$  to  $+141$  (lanes 7 to 9). The positions of primers used to amplify *NUC2* sequences are indicated. The transcription initiation site is mapped by 5' rapid amplification of cDNA ends at 87 nucleotides upstream from ATG. An aliquot of total chromatin sample before the immunoprecipitation reaction was used to control PCR amplifications (lanes 3, 6, and 9). Chromatin isolated from the *nuc1* mutant was used to control the specificity of At-NUC1 antibodies in the ChIP reaction (*nuc1-2* panels).

**(C)** RT-PCR to show *NUC2* and *NUC1* transcripts in wild-type (lane 1) and *met1-1* (lane 2) plants. The amount of cDNA was verified in each reaction by controlling *eIF1α* transcript levels. Absence of genomic contamination in the cDNA samples was verified by amplification of *eIF1α* genomic DNA, which generates higher molecular size bands (lane 3).

**(D)** Immunoblot analysis to detect NUC1 and NUC2 proteins in *nuc1* (lanes 1 and 2), *nuc2-2* (lane 3), *nuc2-2 gNUC2* (lane 4), *met1-1* (lane 5), and wild-type (lane 6) plants. Similar amounts of protein in each membrane were verified by Ponceau S staining.

The ratio between rDNA VAR2 and VAR3 signals remains similar in *nuc2-2* (lane 4) compared with the wild-type sample (lane 2).

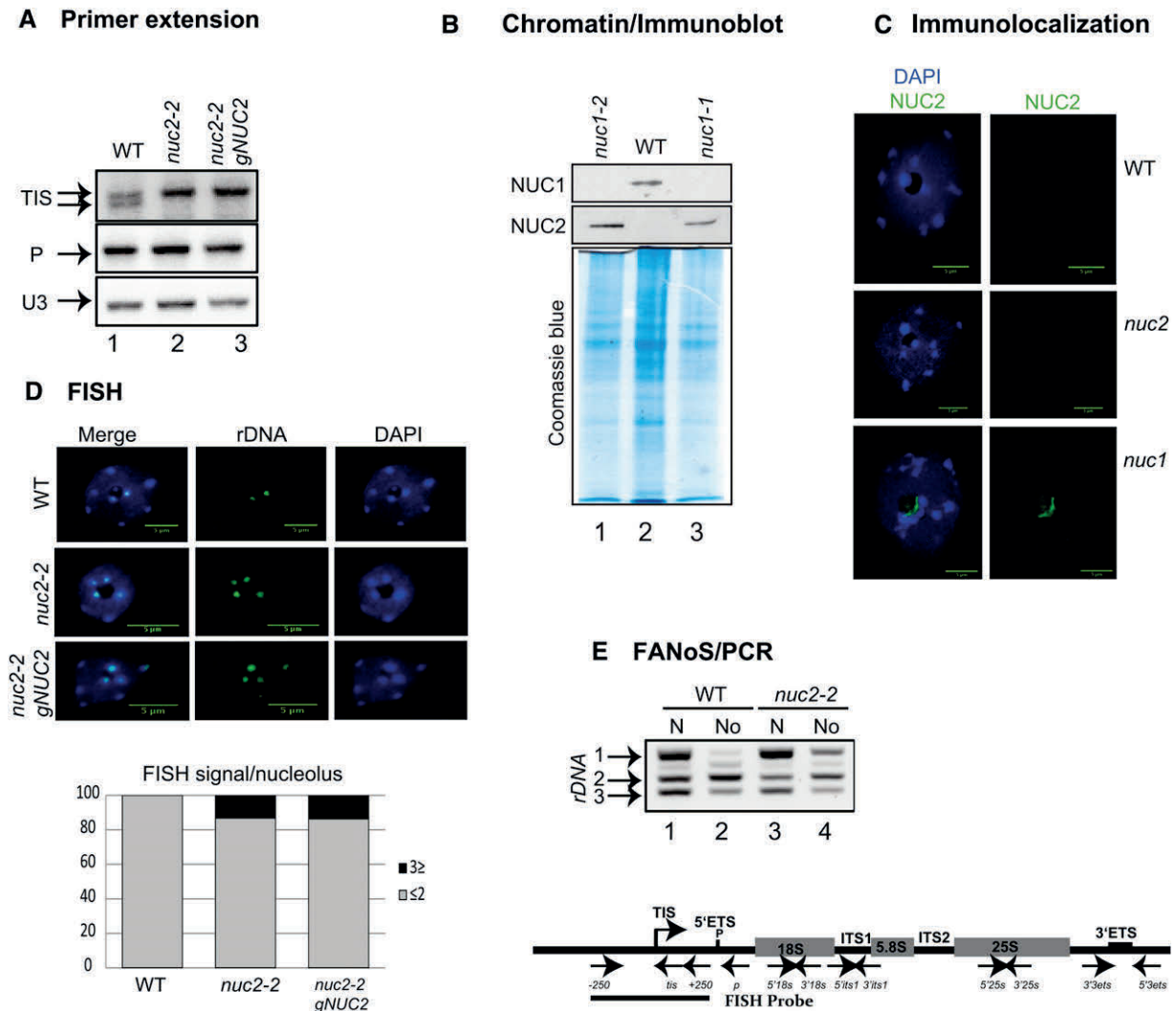
Altogether, these data show that in the *nuc2-2* mutant, rDNA subnuclear localization is altered; rDNA VAR1 is localized and expressed in the nucleolus. These results suggest that some modifications and/or rearrangements of rDNA chromatin occur in *nuc2-2* mutant plants as NUC2 binds chromatin.

#### NUC2 Is Required for the Stability of rDNA Variants Copy Number

Derepression of VAR1 rRNA genes in *nuc2-2* mutant plants could be explained by the observed reorganization of rDNA from inactive to active NOR chromatin (Jakociunas et al., 2013) but also by possible rDNA copy number variation. This phenomenon has previously been observed in *fasciata* (*fas*)

mutant plants (Figure 5A), a subunit of the H3/H4 histone chaperone Chromatin Associated Factor1 complex (Mozgová et al., 2010).

We first quantified 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences in wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants and observed no major variation (Figure 5A, top panel). By contrast, a global decrease of 45S rDNA copy number was detected in *fas2-4* mutant plants, as reported previously (Mozgová et al., 2010). Therefore, we further determined the amount of specific rDNA variants. In this analysis, VAR1, VAR2, and VAR3 rDNA copies represent ~46, 25, and 29%, respectively, of the rRNA genes in wild-type plants. In *nuc2-2* mutants, these numbers showed a relative increase of the VAR1 copy number (~63, 12, and 25%, respectively) (Figure 5B; Supplemental Figure 11). In *nuc2-2 gNUC2* plants, the proportions are similar to the ratio observed in *nuc2-2* mutant plants, indicating that reintroducing the *NUC2*



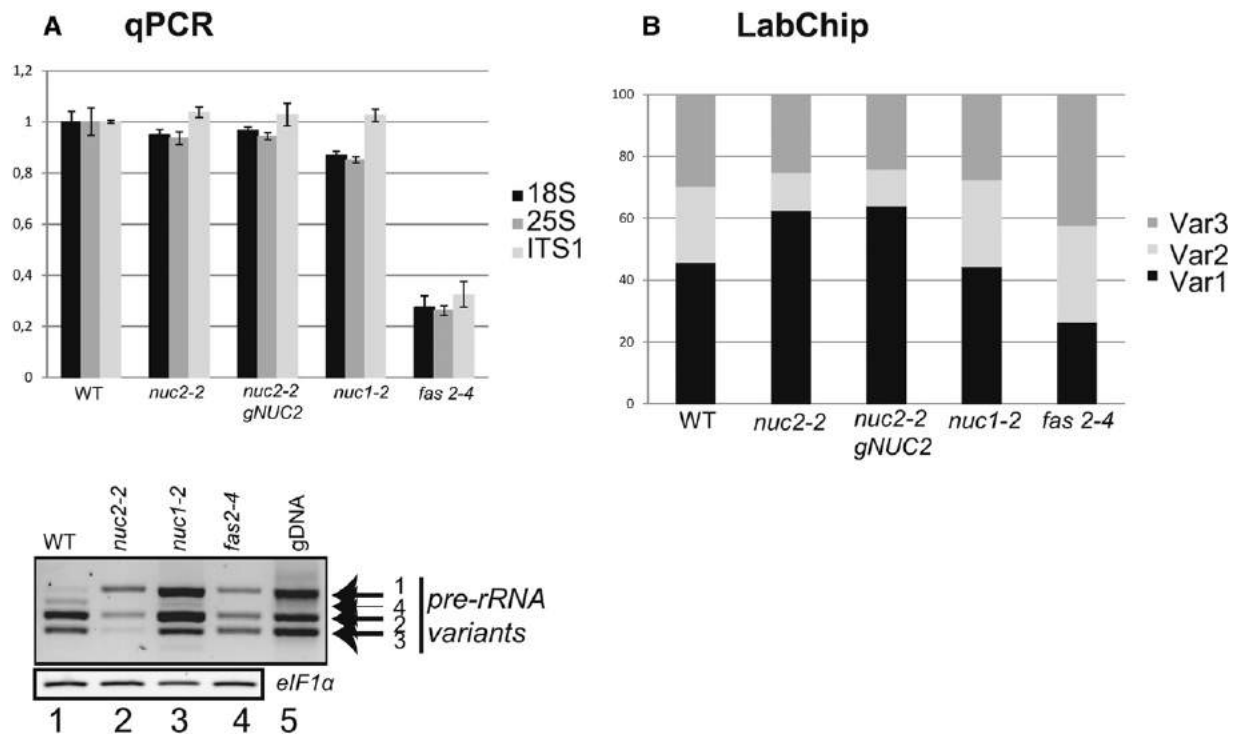


function did not restore normal rDNA variant copy numbers. In addition, analysis of subsequent *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* generations after five selfings in single-seed descent reveals no further changes in the abundance and expression of rDNA variants (data not shown). Finally, no significant changes are observed in *nuc1-2*, suggesting a specific effect of the loss of *NUC2* function on the stability of the VAR1 copy number.

### rDNA Methylation State in *nuc2-2* Mutants

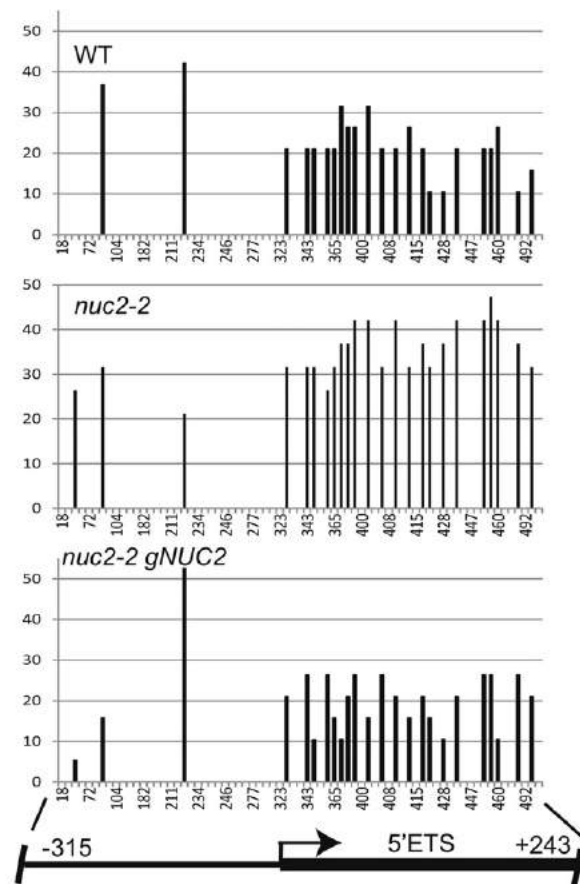
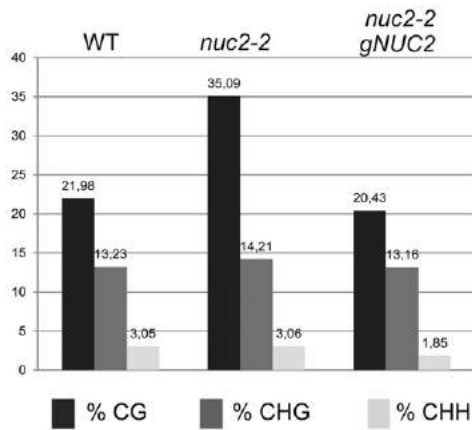
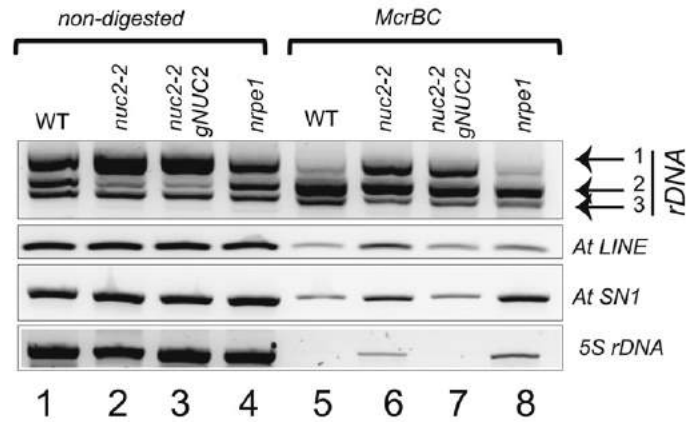
The expression of rRNA VAR1 was recently shown to be associated with CG hypomethylation of the 5' external transcribed spacer (ETS) region in *nuc1* and *hda6* mutant plants (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010). The methylation state of 5' ETS rDNA (from -315 to +243), therefore, was tested by bisulfite sequencing analysis in *nuc2-2*. This reveals a hypermethylated 5' ETS region in *nuc2-2* mutant lines (~35%) compared with wild-type plants (~22%), which was restored to the wild-type level in *nuc2-2 gNUC2* samples. Remarkably, the increased methylation level is restricted to the CG context in the 5' ETS region and is not observed in the upstream promoter domain. CHG and CHH methylation are not affected in *nuc2* plants (Figure 6A).

Because the 5' ETS sequence is shared by all four rDNA variants, bisulfite sequencing does not allow us to determine which rDNA variants are hypermethylated in *nuc2* mutants. Furthermore, bisulfite sequencing of the 3' ETS could not be used because of the higher number of VAR1 copies (Supplemental Figure 12). Consequently, we decided to perform modified cytosine restriction BC (McrBC) PCR restriction analysis, which consists of specifically cleaving methylated DNA and amplifying specific nonmethylated and noncleaved DNA by PCR (Figure 6B; Supplemental Figure 13). This analysis reveals that VAR1 rDNA is highly amplified in both *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* samples (lanes 6 and 7) as compared with wild-type plants (lane 5). This might either result from a global decrease of DNA methylation level on VAR1 rDNA copies or a higher number of unmethylated VAR1 rDNA copies in these plants. By contrast, similar amounts of nonmethylated rDNA VAR2 and VAR3 are detected (lanes 5 to 8). As observed before, a significant reduction of rDNA VAR2 in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants is detected in undigested DNA samples (lanes 2 and 3) compared with control plants (lanes 1 and 4). Only a faint rDNA VAR1 amplification band is detected in wild-type and *nrcp1* plants upon McrBC digestion, revealing that most VAR1 rDNA is methylated in these samples (lanes 5 and 8) (Wierzbicki et al.,



**Figure 5.** The Relative Abundance of rDNA Variants Is Affected in Plants with a Disrupted *NUC2*.

**(A)** Top, quantitative PCR analysis to amplify 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences from wild-type and mutant (*nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, *nuc1-2*, and *fas2-4*) plants. The bar graphs show relative amounts of 18S (black), 25S (dark gray), and ITS1 (gray) rDNA. Bottom, RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old wild-type (lane 1), *nuc2-2* (lane 2), *nuc1-2* (lane 3), and *fas2-4* (lane 4) seedlings to detect 3' ETS pre-rRNA transcripts. Amplification of *eIF1 $\alpha$*  was performed to control similar amounts of cDNA in each sample. PCR on genomic DNA from wild-type plants detects the rDNA variants 1 to 4 (lane 5). **(B)** PCR amplifications of 3' ETS sequences using genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, *nuc1-2*, and *fas2-4* plants. Relative amounts of each rDNA variant were determined using the LabChip GX system. The bar graphs show the percentage of rDNA VAR1 (black), VAR2 (gray), and VAR3 (dark gray).

**A Bisulfite sequencing****B McrBC assay**

**Figure 6.** rDNA Is Hypermethylated in *nuc2-2* Mutant Plants.

(A) Bisulfite sequencing analysis. Top, the bar graphs show the percentage of methylated sites in the rRNA gene sequences (from  $-315$  to  $+243$ ) from wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* plants in CG, CHG, and CHH contexts. Bottom, frequencies at which individual cytosines in a CG context are methylated between  $-315$  and  $+243$  relative to TIS. The scheme shows the positions of rDNA sequences upstream (promoter) and downstream (5' ETS) of TIS. Most of the CG sites localize in the 5' ETS region.

(B) Genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, and *nrpe1* plants digested (lanes 5 to 8) or not (lanes 1 to 4) with McrBC. Amplifications of 3' ETS, At LINE, At SN1, and 5S were performed to detect methylated or unmethylated DNA sequences in *nuc2-2*, *nuc2-2 gNUC2*, and control (wild-type and *nrpe1*) plants.

2008). Note that *At LINE* and *At SINE* repeats, as well as 5S rRNA genes, are hypomethylated in *nuc2-2* (lane 6) as in *nrpe1* control plants (lane 8).

Altogether, *NUC2* disruption results in contrasting variations of rDNA methylation at different loci and on different variants, with a significant decrease of methylated DNA levels on 3' ETS VAR1-specific regions.

#### rDNA Organization and Expression in Wild-Type $\times$ *nuc2* Plants

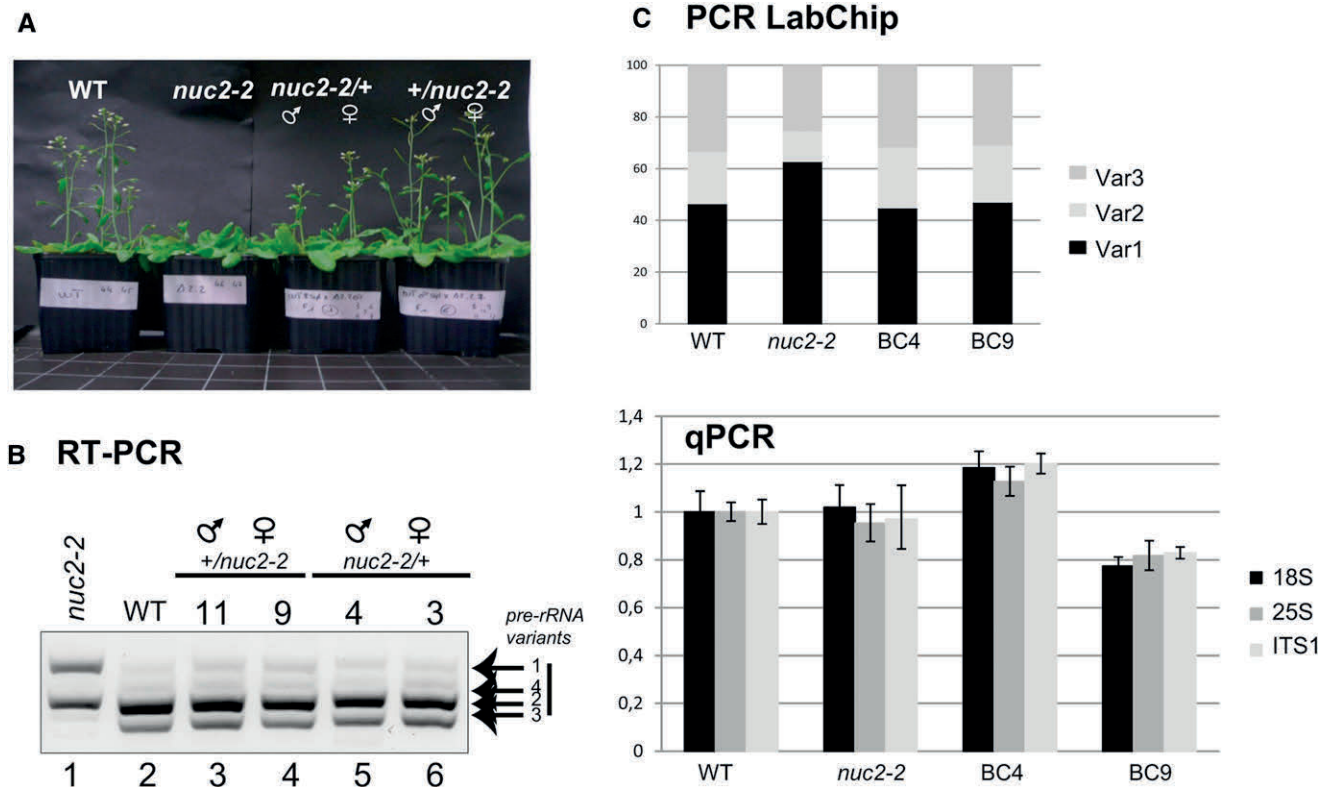
VAR1 rDNA is derepressed in *nuc2* mutant plants, a phenomenon associated with a relative increase of VAR1 copy number in the genome of these plants. Therefore, we determined whether or not the introduction of wild-type rDNA copies could restore normal expression patterns. This was achieved by reciprocally crossing wild-type plants with *nuc2-2* plants (Figure 7). We first observed that F1 plants from backcrossed *nuc2*  $\times$  wild-type (BC4 and BC3) plants and wild-type  $\times$  *nuc2* (BC11 and BC9) plants display wild-type flowering timing (Figure 7A). Moreover,

VAR1 pre-rRNA is repressed, while VAR2 and VAR3 expression is restored to wild-type levels in all the backcrossed lines (Figure 7B). The abundance of rDNA VAR1, VAR2, and VAR3 is basically restored to wild-type levels in the backcrossed *nuc2/+* (45, 24, and 31%) and/or *+nuc2* (47, 23, and 30%) plants (Figure 7C, top panel; Supplemental Figure 14). Interestingly, compared with wild-type and *nuc2-2* plants, the amount of rDNA is higher in *+nuc2* (BC9) and lower in *nuc2/+* (BC4) (Figure 7C, bottom panel).

These results suggest that the expression of rDNA VAR1 in *nuc2-2* and in *nuc2-2 gNUC2* plants is intimately linked to changes in the VAR1:VAR2 copies ratio.

#### NUC1 but Not NUC2 Can Assist Nucleosome Remodeling in Vitro

To obtain insight into how the interaction of nucleolin proteins with chromatin might control rDNA organization and/or expression, we studied the nucleosome remodeling of NUC1 and NUC2 in vitro. Mammalian nucleolin has been reported as being



**Figure 7.** Reintegration of Wild-Type rDNA Restores the Abundance of rDNA Variants and the Repression of VAR1 in *nuc2-2*.

(A) Flowering time analysis of wild-type, *nuc2-2*, and backcrossed plants using pollen from *nuc2-2* (*nuc2*  $\times$  wild type) or from wild-type (wild type  $\times$  *nuc2*) plants.

(B) RT-PCR using cDNA prepared from 15-d-old *nuc2-2* (lane 1), wild-type (lane 2), *+nuc2* (lanes 3 and 4), and *nuc2/+* (lanes 5 and 6) seedlings to detect 3' ETS pre-rRNA transcripts.

(C) The bar graphs show relative amounts of rDNA VAR1 (black), VAR2 (gray), and VAR3 (dark gray) (top) and 18S (black), 25S (gray), and ITS1 (dark gray) (bottom) rDNA sequences in the wild type, *nuc2-2*, *nuc2/+* (BC4), and *+nuc2* (BC9).

[See online article for color version of this figure.]

able to bind nucleosomes and assist chromatin-remodeling activities *in vitro* (Angelov et al., 2006; Rickards et al., 2007). To test these potential “activities” of *Arabidopsis* NUC1 and NUC2, we used an *in vitro* nucleosome-sliding assay consisting of nucleosomes assembled *in vitro* and the remodeling activity of chromatin structure remodeling (RSC) (Angelov et al., 2006).

*In vitro*-reconstituted *Xenopus laevis* nucleosomes were incubated with increasing amounts of RSC, resulting in an efficient mobilization of the nucleosomes and the formation of end-positioned nucleosomes (Supplemental Figure 9A). To determine mobilization by NUC1 and NUC2, we used suboptimal RSC concentrations at which RSC was unable to remodel nucleosomes alone (Figure 8). Nucleosomes were further incubated with increasing amounts of RSC in the absence or presence of 300 ng of NUC1 (lanes 1 to 10) or NUC2 recombinant proteins (lanes 11 to 20). As expected, no detectable nucleosome sliding was observed in the absence of NUC1 (lanes 2 to 5) or NUC2 (lanes 12 to 15). By contrast, the presence of NUC1 in the remodeling reaction results in an efficient mobilization of central nucleosomes to end-positioned nucleosomes (lanes 7 to 10). No sliding was observed in the presence of NUC2 (lanes 17 to 20). Incubation of NUC1 or NUC2 proteins with nucleosomes without RSC induces a slight shift (lanes 6 and 16). Note that no free probe is detected in fractions containing nucleolin, presumably due to the strong DNA binding activity of NUC1 and NUC2 proteins (Supplemental Figure 9B). Altogether, these analyses indicate that NUC1 and NUC2 can bind nucleosomes but that only NUC1 can assist nucleosome remodeling *in vitro*.

## DISCUSSION

### *Arabidopsis* NUC2 Is a Functional Protein Gene

The genome of *Arabidopsis*, like most plant genomes, contains two nucleolin protein genes: *NUC1* and *NUC2* (Supplemental Figure 1). Previously, *Arabidopsis* *NUC1* was demonstrated to be

a plant functional homolog of animal and yeast nucleolins (Kojima et al., 2007; Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010). These studies led us to raise the question about the physiological significance of the second nucleolin gene in plants.

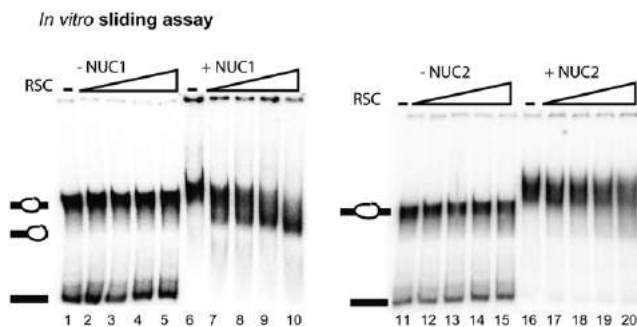
*Arabidopsis* *NUC2* knockout plants are viable and do not exhibit a significant growth phenotype, but they have a late flowering phenotype. This suggests that *NUC2* is not an essential gene or that *NUC1* might rescue the function of *NUC2* in *nuc2* mutants. Similarly, *NUC2* at least partially rescues the loss of *NUC1* function in *nuc1* plants (Pontvianne et al., 2007). Accordingly, simultaneous disruption of *NUC1* and *NUC2* is lethal, indicating that *NUC2* can fulfill some essential functions of *NUC1*. Late flowering in *nuc2-2* mutant plants associates with the overexpression of *FLC*, a gene that plays a central role in flowering time regulation in *Arabidopsis* (Crevillén and Dean, 2011). Remarkably, *NUC2* disruption affects the expression of only a small subset of protein-coding and non-protein-coding genes besides *FLC*. No genes related to 45S pre-rRNA transcription or processing are upregulated or downregulated in *nuc2* plants, suggesting that most if not all rDNA phenotypes observed in *nuc2* plants are essentially linked to the absence of *NUC2* (Figures 1 and 4 to 7; Supplemental Figures 4, 11, 13, and 14).

Nucleolin proteins are histone chaperones (Angelov et al., 2006), and, as expected, *NUC1* and *NUC2* are able to bind nucleosomes *in vitro* and are found in chromatin fractions *in vivo* (Figures 4 and 8). The involvement of histone chaperone activities in flowering time has already been reported in plants with disrupted facilitate chromatin transcription complex (FACT) H2A-H2B histone chaperone activity genes (Lolas et al., 2010; Van Lijsebettens and Grasser, 2010). However, in contrast with the *Arabidopsis* *NUC2* gene, the absence of the SSRP1 and SPT16 FACT subunits leads to reduced expression of *FLC* and to early flowering. FACT and nucleolin might have different substrate specificities and act at different genomic positions; therefore, it remains to be determined whether their activities act directly on the *FLC* gene.

*NUC2* expression is restricted to some plant tissues and organs and is developmentally controlled during early seedling establishment. *NUC2* expression is also significantly lower than *NUC1* expression. Interestingly, *NUC2* promoter activity is antagonistic to *NUC1* promoter activity (Figure 2; Supplemental Figures 5 to 7). The higher expression of *NUC2* could be a consequence of the absence or modification of *NUC1* protein. Increased expression seems to be at the transcriptional, and possibly also the posttranscriptional, level (Figure 3; Supplemental Figure 8). *NUC1* may play a direct role in regulating *NUC2* gene expression or, indirectly, by controlling the expression of an unknown repressor. In agreement with this, *NUC1* has also been implicated in the expression of *RIBOSOMAL PROTEIN* genes transcribed by RNA pol II (Kojima et al., 2007). Moreover, transcriptional and post-transcriptional regulation of pol II-transcribed genes by nucleolin proteins has been widely reported in animal cells (Mongelard and Bouvet, 2007; Tajrishi et al., 2011).

### Disruption of *NUC2* Affects rDNA Genomic Organization and Gene Silencing

The expression of 45S rDNA VAR1 in *nuc2-2* mutants is a surprising observation, considering the hypermethylated state of 5'



**Figure 8.** NUC1 and NUC2 Binding and Remodeling of Nucleosomes.

Centrally positioned nucleosomes were incubated with increasing (0.2, 0.4, 0.8, and 1.6  $\mu$ L) amounts of RSC in the absence (lanes 2 to 5 and 12 to 15) or presence (lanes 7 to 10 and 17 to 20) of 300 ng of recombinant His-NUC1 or His-NUC2. Lanes 1 and 11 show nucleosomes alone, and lanes 6 and 16 show nucleosomes with 300 ng of His-NUC1 and His-NUC2, respectively. The migrations of centrally positioned nucleosomes, mobilized nucleosomes, and the  $^{32}$ P radioactively end-labeled DNA are indicated on each EMSA gel.

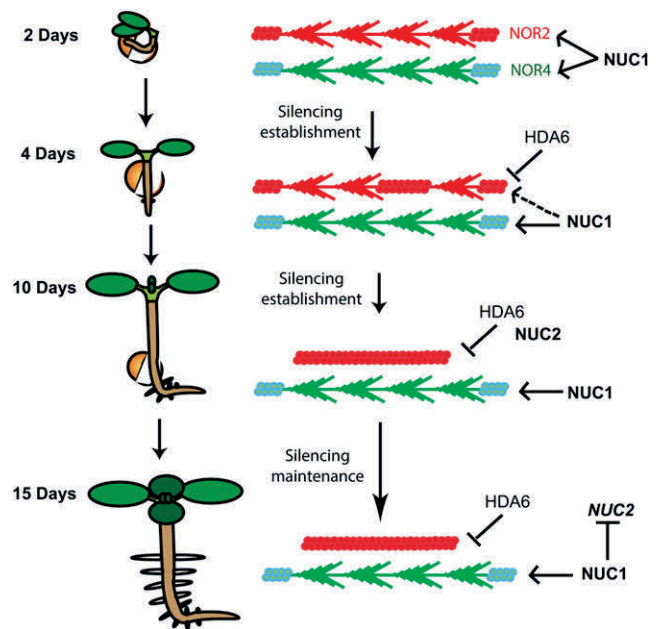
ETS rDNA in *nuc2-2* plants (Figure 6), which contrasts with the hypomethylation and chromatin decondensation of rDNA previously observed in *nuc1* plants (Pontvianne et al., 2007, 2010). Nevertheless, how nucleolin affects DNA methylation remains unclear. Moreover, in contrast with *nuc1* plants, in which transcription from the TIS is not greatly affected, we observed that most of the detected transcripts initiate from a single nucleotide position in *nuc2-2* plants (Figure 4). In wild-type and *nuc1* mutant plants, one signal might correspond to the transcription of rDNA VAR2 and another to VAR3. The unique TIS in *nuc2-2* could result from decreased levels of VAR3 pre-rRNA, assuming that the TIS of VAR1 pre-rRNA is similar to that of VAR2.

Quantitative analysis of 45S rDNA variants reveals no major changes in the amount of total rDNA in *nuc2-2* compared with wild-type plants. However, we observed a significant increase of VAR1 and decrease of VAR2 rDNA copy numbers in these plants (Figure 5). Similarly, plants expressing a low level of *NUC2* transcripts (*nuc2-1* mutant plants) display changes in the abundance of variants, but in these plants the amount of rRNA genes is increased (Supplemental Figure 2). This is in contrast with *fas* mutants, which display a reduction of rDNA copies and activation of VAR1, or *nuc1* mutants, where the number and abundance of rDNA variants are not affected (Figure 5) (Mozgová et al., 2010; Pontvianne et al., 2013). Disruption of the histone methyltransferases *ATXR5/6* also induces the expression of normally silent rDNA VAR1 and an increased or reduced number of silent and active rDNA copies, respectively (Pontvianne et al., 2012). However, in contrast with *atxr5/6*, we do not detect significant changes in the endoreplication of the rDNA variant copies in the *nuc2-2* mutants (data not shown). Remarkably, the relative abundance of rDNA variants is restored to the wild-type level in F1 siblings upon backcrossing the *nuc2-2* plants with wild-type plants, with repression of VAR1 and transcription of VAR2 and VAR3 (Figure 7). This shows that reintroduction of rDNA from wild-type plants, rather than the *NUC2* gene, is able to reestablish the wild-type functional organization of rDNA in *nuc2-2* plants.

In agreement with the observation that NOR2 is transcriptionally silent (Fransz et al., 2002), we have observed that inactive rRNA VAR1 genes localize mainly in NOR2, while the active VAR2 and VAR3 rRNA genes are in NOR4 (J. Sáez-Vásquez, F. Barneche, and C. Pikaard, unpublished data). Although we do not exclude alternative mechanisms, gene conversion (Schuermann et al., 2005) of rRNA could explain the variation in the abundance of rDNA variants in *nuc2-2* and *nuc2-2 gNUC2* plants. Gene conversion might provoke the translocation of VAR1 copies between different NORs, thereby relocating rDNA VAR1 copies in largely hypomethylated regions. VAR1 copies are highly methylated in a wild-type context, and their increased abundance might explain the increased global DNA methylation levels of 5' ETS rDNA in *nuc2-2* plants. However, some rDNA VAR1 copies became hypomethylated, as detected by McrBC analysis (Figure 6; Supplemental Figure 13). In the wild type, VAR1 represents 50% of all rDNA; consequently, the increased number in *nuc2-2* plants makes it difficult to determine the contribution of each rDNA variant to global rRNA gene methylation levels (Supplemental Figure 12). It is also possible that NOR2 is

not completely silenced during seedling establishment (Figure 9); consequently, some VAR1 units might be transcribed and associated with a single nucleolus in *nuc2-2* (Figure 4D). Interestingly, VAR1 rDNA copies (located either in NOR2 or NOR4) associate with the nucleolus in *nuc2-2* plants, a relocation that probably correlates with their switch to a transcriptionally active state (Figure 4E).

So far, we cannot disentangle the respective effects of rDNA variant dosage, delocalization, and activation on the derepression of VAR1 in *nuc2* mutant plants. However, it is tempting to speculate that it is due to VAR1 relocation from NOR2 to NOR4. Indeed, it has been demonstrated that rDNA can be integrated and expressed at ectopic locations and form nucleolar structures (Karpen et al., 1988; Oakes et al., 1993; Floutsakou et al., 2013). Therefore, our results fit with a model in which the switch between active and/or repressed rDNA depends on the genomic and chromatin organization of the NOR (Preuss et al., 2008).



**Figure 9.** *NUC2* Is Required for Chromatin Dynamics during Developmental Transitions.

In this model, 45S rDNA VAR1 localizes in NOR2 (red) and VAR2 and VAR3 localize in NOR4 (green). Early in seed germination (2 d), both NOR2 and NOR4 are decondensed and transcriptionally active. NUC1 protein is associated with each NOR, as NUC1 binds to active genes (Pontvianne et al., 2010). Then, throughout germination, HDA6 participates in the chromatin silencing of rDNA VAR1 (Earley et al., 2010; Benoit et al., 2013). NOR2 becomes progressively silenced/condensed, and NUC1 dissociates. At 8 to 10 d, *NUC2* transcripts and protein accumulate and bind “silenced” chromatin to participate in the heterochromatin establishment of NOR2. At the end of seed germination transition, NUC1 might play a role in repressing *NUC2* gene expression at the transcriptional and/or posttranscriptional levels.

## A Role of Nucleolin Proteins during Developmental Transition

So far, duplicated genes have been associated with gene dosage and neofunctionalization (Magadum et al., 2013). The results presented in this work, associated with previous studies, indicate that conserved and duplicated nucleolin genes have antagonistic activities in controlling rDNA organization and expression. To our knowledge, only a few duplicated genes with antagonistic roles have been described in *Arabidopsis*, including the duplicated RecQ helicases involved in homologous recombination and DNA repair (Hartung et al., 2007). How do NUC1 and NUC2 functionally interact in *Arabidopsis*? NUC2 protein accumulation during seedling development (Figure 2) temporally correlates with NOR condensation and rDNA VAR1 repression (Earley et al., 2010; van Zanten et al., 2011; Benoit et al., 2013). Accordingly, upon heterochromatin establishment of NOR2, the expression of *NUC2* could be repressed by NUC1 (Figure 3). Remarkably, both NUC1 and NUC2 proteins associate with chromatin and can bind nucleosomes, although only NUC1 is able to assist remodeling (Figure 8; Supplemental Figure 9). As reported previously, NUC1, as well as human nucleolin, can bind transcriptionally competent rDNA chromatin and might facilitate rDNA transcription (Pontvianne et al., 2010; Cong et al., 2012). Meanwhile, NUC2 might bind nucleosomes to induce and/or maintain a repressive rDNA chromatin state during seedling growth (Figure 9).

In animal and yeast cells, the maintenance of rDNA methylation and gene copy number plays an important role in genome integrity and regulation (Paredes and Maggert, 2009; Ide et al., 2010). In *Arabidopsis*, it has been demonstrated that rDNA sequences might enhance homologous recombination (Urawa et al., 2001). We also reported high variability of 45S rDNA variants in the genome of *Arabidopsis* ecotypes (Abou-Elail et al., 2011). Such a mechanism is subject to evolutionary constraints, as demonstrated by the observation that variations in genome size of *Arabidopsis* ecotypes are largely due to 45S rDNA copy number (Long et al., 2013). It would be interesting to determine how the variability of rDNA and nucleolin protein sequences, as well as other proteins involved in chromatin-based processes, can influence chromatin organization and the controlled expression of highly repeated sequences such as ribosomal genes.

## METHODS

### Plant Growth Conditions and Isolation of Mutants

All lines were derived from *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 ecotype. Seeds were first sown on Murashige and Skoog (MS) medium (4.7 g/L MS medium, 0.5 g/L MES, 10 g/L Suc, and 10 g/L plant agar) 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-h/8-h (light/dark) cycle (soil plants). Seeds corresponding to *nuc2-1* (SALK\_542511) and *nuc2-2* (GABI\_178D01) mutant plants were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.life.nott.ac.uk>). The *nuc1* and *fas2.4* (third generation) mutant lines used in this work have been described (*nuc1*: Kojima et al., 2007; Pontvianne et al., 2007, 2010; *fas2.4*: Mozgová et al., 2010; Pontvianne et al., 2013).

### Immunoblotting on Total and Chromatin Protein Fractions

Plant material (0.1 g) was homogenized and extracted in 500  $\mu$ L of 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and a 1:100 dilution (v/v) of anti-protease cocktail inhibitor (Sigma). The extracts were cleared by centrifugation at 13,000g for 15 min and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

To obtain protein chromatin fractions from wild-type, *nuc1-1*, and *nuc1-2* plants, chromatin samples were prepared as described previously (Pontvianne et al., 2010) and proteins were extracted in 1 $\times$  SDS-Laemmli buffer.

Then, SDS-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously (Sáez-Vasquez et al., 2004). The membranes were hybridized with a 1:10,000 dilution of  $\alpha$ -At-NUC1 or a 1:7,000 dilution of  $\alpha$ -At-NUC2 as described previously (Pontvianne et al., 2007, 2010).

### Methods Related to Nucleic Acid

Total RNA was extracted from 15-d-old *Arabidopsis* plants using Trizol reagent (Amersham Biosciences) and treated with Turbo DNase (Ambion) for 60 min to eliminate contaminant DNA. First-strand cDNA synthesis was performed on 1.5  $\mu$ g of treated RNA with the oligo(dT) and/or 3'3ets primer (for 3' ETS rDNA sequences) using the GoScript Reverse Transcription System kit following the manufacturer's instructions (Promega).

RT-PCR of 24 to 35 cycles was performed using a PTC-200 device (MJ Research). Primer pairs 5'*nuc1/3'nuc1*, 5'*nuc2/3'nuc2*, and 5'*3ets/3'3ets* were used to amplify *NUC1*, *NUC2*, and 3' ETS pre-rRNA transcripts, respectively.

Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 and MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR assay (Eurogentec). Primers 5'*nuc2q/3'nuc2q* and *q5'flc/q3'flc* were used to detect *NUC2* and *FLC* transcripts, respectively, and primers 5'*18S/3'18S*, 5'*25S/3'25S*, and 5'*ITS1/3'ITS1* were used to amplify 18S, 25S, and ITS1 rDNA sequences, respectively. The *Actin* gene was used as an internal standard, and results were analyzed using the comparative cycle threshold method relative to input.

For the relative abundance of each class of rDNA (variant), PCR was performed with primers 5'*3ets/3'3ets*. PCR products were run on the LabChip GX/GX II (Caliper; Life Sciences) and analyzed with the LabChip GX DNA Assay Analysis software (which calculates the size and concentration of each nucleic acid fragment) according to the manufacturer's instructions.

Primer extension analysis was performed using 15  $\mu$ g of total RNA and specific 5' end-labeled primers as described previously (Sáez-Vasquez et al., 2004). Primers used were *tis* for the detection of primary pre-rRNA precursors (+104 nucleotides from TIS) and *p* for the detection of primary pre-rRNA precursors cleaved at the P site (+1274 nucleotides from TIS). Primer 3'*U3* was used for the detection of U3snoRNA as a loading control.

### Cloning of *Arabidopsis NUC2* Promoter Sequences and Detection of GUS Activity

Approximately 1.5 kb of the *NUC2* promoter sequence was amplified from genomic DNA and fused to a GUS reporter gene in the vector pGWB433 (Nakagawa et al., 2007). The *pAtNUC1:GUS* construct in pCAMBIA 1381xa was described previously (Pontvianne et al., 2007).

Histochemical detection of GUS activity was performed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc) as a substrate. Seedlings were placed in X-Gluc buffer solution (1 mM X-Gluc, 100 mM Tris-HCl, pH 7, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM potassium ferrocyanide, and 0.5 mM potassium ferricyanide) and incubated at 37°C for 12 h. Samples were then incubated in 70% ethanol for 2 h and cleared in Hoyer's medium. For analysis of siliques, samples were placed in 90% acetone on ice

for 1 h, followed by X-Gluc buffer as described above. All microscopic GUS images were observed using a Zeiss Axioskop 2 microscope and recorded using a Leica DC 300 FX digital camera.

### ChIP and FISH

Antibodies against At-NUC1 and ChIP reactions were described previously (Pontvianne et al., 2007, 2010). PCR was performed using primers 5'*nuc2a/3'nuc2a*, 5'*nuc2b/3'nuc2b*, and 5'*nuc2c/3'nuc2c* to amplify *NUC2* sequences –466/–210, –307/–38, and –137/+141, respectively.

DNA FISH analysis was performed using nuclei from leaves of 4-week-old plants as described previously (Pontvianne et al., 2007). The biotin-labeled probe was detected using digoxigenin (1:200; Roche) followed by sheep anti-digoxigenin antibody conjugated with the fluorochrome Alexa 480 (1:200; Invitrogen). Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium with 1 µg/mL DAPI and then observed by confocal microscopy (Axio observer.Z1 microscope with the LSM700 scanning module; Zeiss). (A more detailed description of the immunofluorescence experiment is available in Pontvianne et al., 2012).

### Immunostaining

Immunofluorescence was performed using 4-week-old leaves (the wild type, *nuc1*, and *nuc2*). Treated leaves (Supplemental Methods) were incubated at 4°C overnight with α-At-NUC2 (1:500) and then with anti-rabbit antibody coupled with Alexa 488 (1:1000; Invitrogen) for 3 h at room temperature. Slides were then mounted in Vectashield containing DAPI solution. Observation and imaging were performed using a confocal microscope (LSM 700 from Zeiss).

### FANoS

The *nuc2-2* plants were crossed with wild-type Columbia-0 plants expressing FIBRILLARIN2 (FIB2) protein fused to yellow fluorescent protein (YFP) and under the control of the 35S cauliflower mosaic virus promoter. Then, F1 and F2 plants were selected to isolate homozygous *nuc2-2* plants containing 35S:FIB2:YFP transgene. Three-week-old leaves from the F3 generation were then used to isolate nuclei and nucleoli by FANoS as described previously (Pontvianne et al., 2013). The cell sorter used was an ARIA II special order (BD Biosciences). Total genomic DNA was extracted from nucleoli purified from wild-type and *nuc2-2* plants expressing the FIB:YFP construct and amplified by PCR to identify the rDNA associated with the nucleolus (i.e., those that are transcriptionally active).

### Bisulfite and McrBC Analyses

Genomic DNA from wild-type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* mutant plants was extracted using the DNA Easy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

For bisulfite analysis, 500 ng of DNA was digested overnight using 20 units of *Bam*HI restriction enzyme prior to bisulfite conversion. Bisulfite treatment was performed using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen). The primers –315 and +243 were used to amplify rRNA gene sequences (from –315 to +243); the resulting PCR products were cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced. Approximately 25 clones per sample were analyzed using the CyMATE method (Hetzl et al., 2007).

For McrBC analysis, 500 ng of DNA was digested using McrBC enzyme (Qiagen), which cuts methylated DNA. Then, PCR was performed on equal amounts of digested and undigested DNA using the HotStart goTag polymerase (Promega). PCR (35 cycles) was performed with primers 5'*3ets/3'3ets*, 5'*5s/3'5s*, 5'*AtLINE/3'AtLINE*, and 5'*AtSN1/3'AtSN1* to amplify rDNA sequences (45S and 5S) and transposable elements (At *LINE* and At *SN1*). As a control, we used the demethylated *nripe1* mutant.

### Nucleosome Reconstitution and Remodeling

Recombinant *Xenopus laevis* full-length histone proteins were purified from *Escherichia coli* cells as described earlier (Luger et al., 1999). The 255-bp DNA fragment containing the centrally positioned nucleosome sequence 601 at the middle or at the end of the sequence was amplified by PCR from pGEM3Z-601 (kindly provided by B. Bartholomew and J. Widom) and end labeled using T4-polynucleotide kinase in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Nucleosome reconstitution was performed by the salt dialysis method (Angelov et al., 2006). Carrier DNA (150 to 200 bp, 2 mg) and 50 ng of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled 601 DNA was mixed with equimolar amounts of histone octamer in nucleosome reconstitution buffer containing 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, and 5 mM β-mercaptoethanol. Nucleosomes (50 ng, 0.2 pmol) were incubated with RSC in remodeling buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% glycerol, 100 mg/mL BSA, 1 mM DTT, 0.02% Nonidet P-40, 40 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM ATP for 45 min. The reaction was stopped by adding 1 µg of plasmid DNA. Nucleosome position was then analyzed by native PAGE.

### Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: At1g48920 (*NUC1*) and At3g18610 (*NUC2*).

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure 1.** Phylogenetic Tree of Nucleolin Proteins from Plants.

**Supplemental Figure 2.** Characterization of *nuc2-1* Mutant Plants.

**Supplemental Figure 3.** Characterization of Nucleolin Double Mutants.

**Supplemental Figure 4.** List of Genes Upregulated or Downregulated in *nuc2-2* Plants Identified by RNA-seq.

**Supplemental Figure 5.** Analysis in Silico to Compare Relative Expression Levels of *NUC1* and *NUC2*.

**Supplemental Figure 6.** *NUC1* and *NUC2* Expression in Response to Auxin.

**Supplemental Figure 7.** *NUC2* and *NUC1* Promoter Activities during Silique Development.

**Supplemental Figure 8.** Mechanisms Controlling *NUC2* Gene Expression.

**Supplemental Figure 9.** Titration of RSC, EMSA with *NUC1* and *NUC2*, and Immunolocalization of *NUC2*.

**Supplemental Figure 10.** Immunolocalization of *NUC1* in Wild-Type and *nuc2* Mutant Plants.

**Supplemental Figure 11.** LabChip Data of the Abundance of rDNA Variants in Wild-Type, *nuc2*, *nuc2 gNUC2*, *nuc1*, and *fas2* Plants.

**Supplemental Figure 12.** Bisulfite Analysis of 3' ETS rDNA Sequences.

**Supplemental Figure 13.** PCR and LabChip Data with Different PCR Cycles for McrBC Experiments.

**Supplemental Figure 14.** PCR and LabChip Data with Different PCR Cycles for the Abundance of rDNA Variants in Wild-Type, *nuc2*, and Wild-Type × *nuc2* Backcrossed Plants.

**Supplemental Table 1.** FISH Data in Wild-Type, *nuc2-2*, and *nuc2-2 gNUC2* Plants.

**Supplemental Table 2.** Primer List.

**Supplemental Methods.** Immunostaining, RNA-seq, Bisulfite, EMSA, and Bioinformatics Analyses.

**Supplemental Data Set 1.** Alignment of Nucleolin Proteins.**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank F. Barneche for critical reading of the manuscript and R. Cooke for comments and correction of the English, M. Laudie for bisulfite sequencing, Marie-Christine Carpentier and Christelle Llauro for RNA-seq bioinformatics analysis, Z. Haftek-Terreau for the production of histone recombinant proteins, and B. Bartholomiew and J. Widom for providing pGEM3Z-601. We also thank the flow cytometry facility of Montpellier RIO Imaging. Mutant plants *met1-1*, *fas2-4*, and *npr1* were provided by C. Pikaard, J. Fajkus, and T. Lagrange, respectively. This work was supported by the CNRS (Grants CNRS/JSPS 2008-2009 number PRC449 and ANR SVSE2\_SUBCELIF 087217). M.A.-E. was supported by a fellowship from the Egyptian government and N.D. by a fellowship from the Université de Perpignan Via Domitia.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

J.S.-V. conceived and directed the project and wrote the article. K.N., P.B., and M.E. designed research. N.D. and M.A.-E. conducted the majority of experiments. F.P. and S.D. performed FANoS and nucleosome assays. S.N. and S.R. performed RNA sequence analysis. H.K., S.U., A.d.B., P.C., and R.M. contributed to the research.

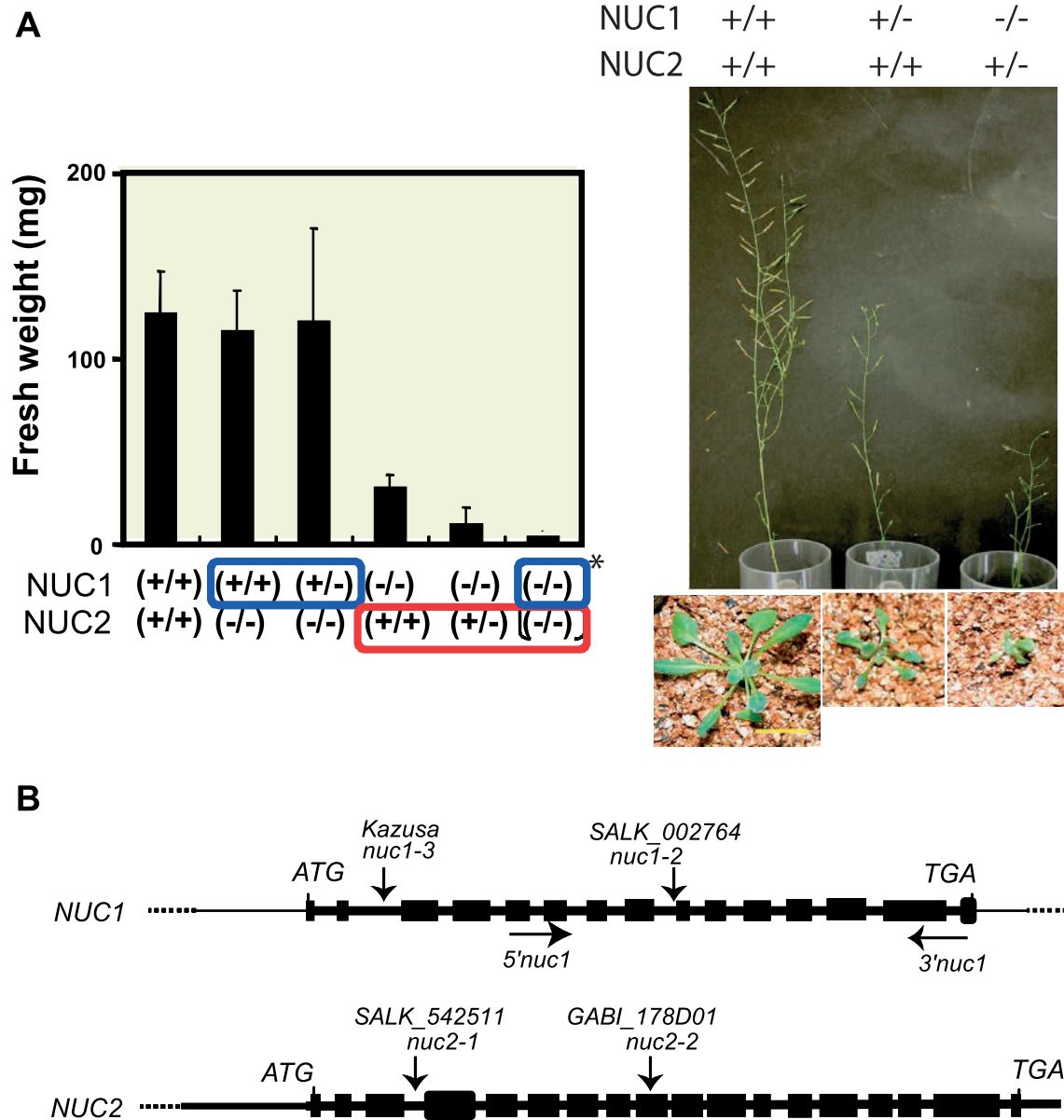
Received February 3, 2014; revised February 24, 2014; accepted March 10, 2014; published March 25, 2014.

**REFERENCES**

- Abou-Ellail, M., Cooke, R., and Sáez-Vásquez, J. (2011). Variations in a team: Major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**: 294–299.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongélard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., and Bouvet, P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* **25**: 1669–1679.
- Benoit, M., Layat, E., Tourmente, S., and Probst, A.V. (2013). Heterochromatin dynamics during developmental transitions in *Arabidopsis*—A focus on ribosomal DNA loci. *Gene* **526**: 39–45.
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., and Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* **40**: 9441–9454.
- Crevillén, P., and Dean, C. (2011). Regulation of the floral repressor gene FLC: The complexity of transcription in a chromatin context. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 38–44.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: Suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* **24**: 1119–1132.
- Floutsakou, I., Agrawal, S., Nguyen, T.T., Seoighe, C., Ganley, A.R., and McStay, B. (2013). The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Res.* **23**: 2003–2012.
- Franz, 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.
- Grummt, I., and Längst, G. (2013). Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**: 393–404.
- Hartung, F., Suer, S., and Puchta, H. (2007). Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 18836–18841.
- Hetzl, J., Foerster, A.M., Raidl, G., and Mittelsten Scheid, O. (2007). CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J.* **51**: 526–536.
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**: 693–696.
- Jakociunas, T., Domange Jordö, M., Ait Mebarek, M., Bünner, C.M., Verhein-Hansen, J., Oddershede, L.B., and Thon, G. (2013). Subnuclear relocalization and silencing of a chromosomal region by an ectopic ribosomal DNA repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: E4465–E4473.
- Karpen, G.H., Schaefer, J.E., and Laird, C.D. (1988). A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev.* **2**: 1745–1763.
- Khurts, S., Masutomi, K., Delgermaa, L., Arai, K., Oishi, N., Mizuno, H., Hayashi, N., Hahn, W.C., and Murakami, S. (2004). Nucleolin interacts with telomerase. *J. Biol. Chem.* **279**: 51508–51515.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Sáez-Vásquez, J., Echeverría, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S., and Nakamura, K. (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* **49**: 1053–1063.
- Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* **13**: 599–609.
- Layat, E., Sáez-Vásquez, J., and Tourmente, S. (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 267–276.
- Lolas, I.B., Himanen, K., Grönlund, J.T., Lynggaard, C., Houben, A., Melzer, M., Van Lijsebettens, M., and Grasser, K.D. (2010). The transcript elongation factor FACT affects *Arabidopsis* vegetative and reproductive development and genetically interacts with HUB1/2. *Plant J.* **61**: 686–697.
- Long, Q., et al. (2013). Massive genomic variation and strong selection in *Arabidopsis thaliana* lines from Sweden. *Nat. Genet.* **45**: 884–890.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999). Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* **119**: 1–16.
- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., and Ravikesavan, R. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* **92**: 155–161.
- Mongelard, F., and Bouvet, P. (2007). Nucleolin: A multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* **17**: 80–86.
- Mozgová, I., Mokros, P., and Fajkus, J. (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 2768–2780.
- Nakagawa, T., et al. (2007). Improved Gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2095–2100.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W., and Nomura, M. (1993). Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2441–2455.
- Paredes, S., and Magerl, K.A. (2009). Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 17829–17834.
- Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M.A., Fuchs, J., and Schubert, I. (2004). Chromosome territory

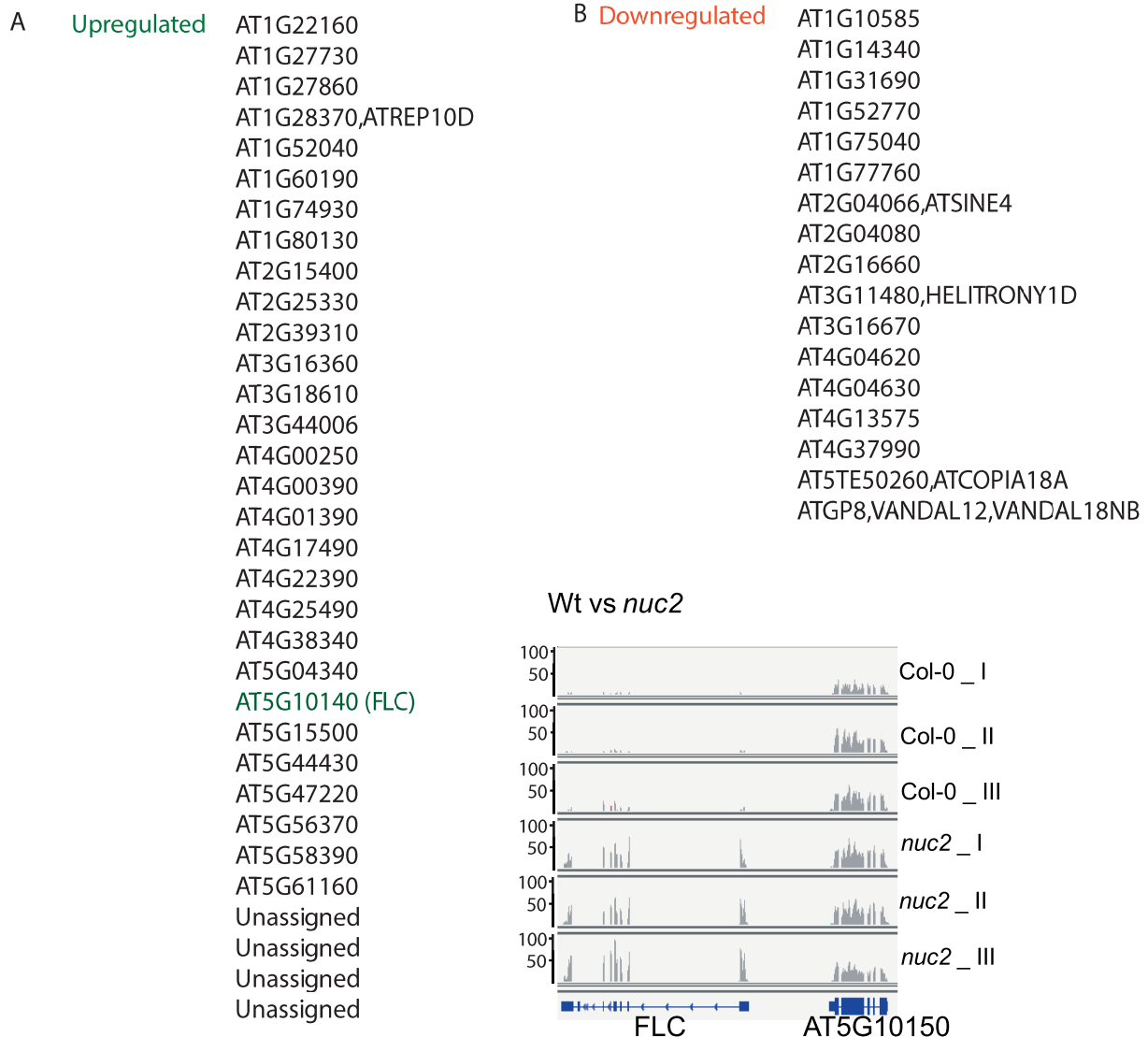


- arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
- Petricka, J.J., and Nelson, T.M.** (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* **144**: 173–186.
- Pontvianne, F., et al.** (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **6**: e1001225.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Feng, W., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., and Pikaard, C.S.** (2012). Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev.* **26**: 945–957.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Mozgová, I., Hassel, C., Pontes, O.M., Tucker, S., Mokros, P., Muchová, V., Fajkus, J., and Pikaard, C.S.** (2013). Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev.* **27**: 1545–1550.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., and Sáez-Vásquez, J.** (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* **18**: 369–379.
- Preuss, S.B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R.J., Mosher, R., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Baulcombe, D.C., Viegas, W., and Pikaard, C.S.** (2008). Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol. Cell* **32**: 673–684.
- Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., and LeRoy, G.** (2007). Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell Biol.* **27**: 937–948.
- Sáez-Vásquez, J., and Gadal, O.** (2010). Genome organization and function: A view from yeast and Arabidopsis. *Mol. Plant* **3**: 678–690.
- Sáez-Vásquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverría, 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.
- Schuermann, D., Molinier, J., Fritsch, O., and Hohn, B.** (2005). The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet.* **21**: 172–181.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., and Tuteja, N.** (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* **4**: 267–275.
- Tuteja, R., and Tuteja, N.** (1998). Nucleolin: A multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**: 407–436.
- Urawa, H., Hidaka, M., Ishiguro, S., Okada, K., and Horiuchi, T.** (2001). Enhanced homologous recombination caused by the non-transcribed spacer of the rDNA in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 546–555.
- Van Lijsebettens, M., and Grasser, K.D.** (2010). The role of the transcript elongation factors FACT and HUB1 in leaf growth and the induction of flowering. *Plant Signal. Behav.* **5**: 715–717.
- van Zanten, M., Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P., and Soppe, W.J.** (2011). Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 20219–20224.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**: 635–648.



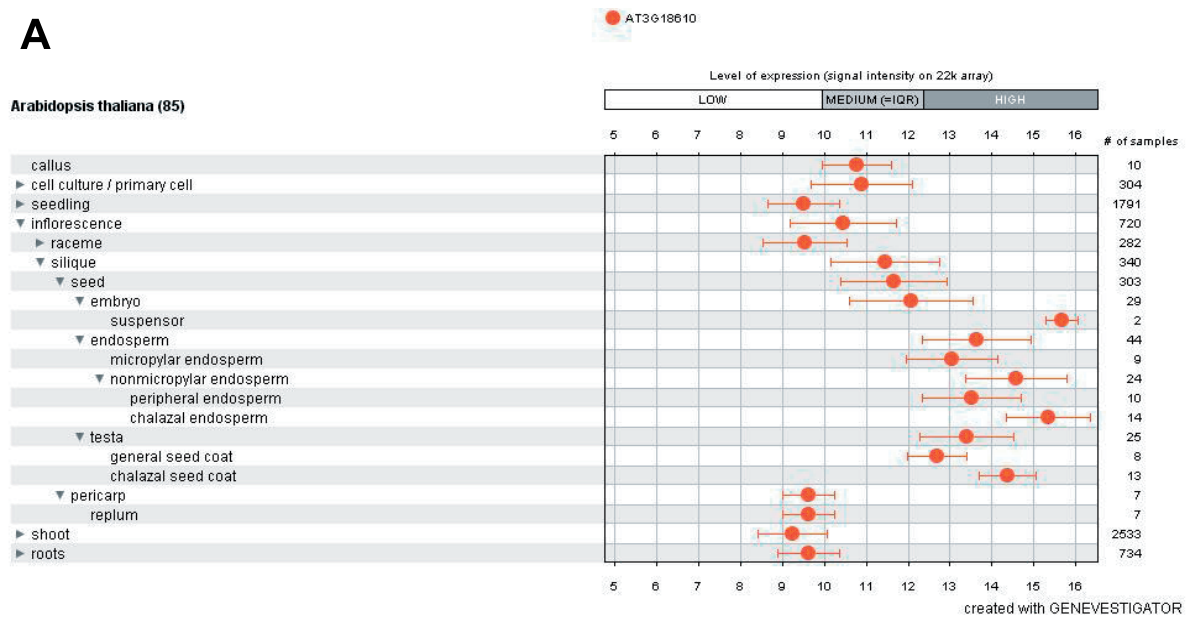
**Supplemental Figure 3: A)** Analysis of WT, *nuc1-3* (Kojima et al., 2007), *nuc2-1* (SALK\_542511) and *nuc1-3nuc2-1* double mutant plants. Left: Bar graph shows fresh weight of WT, *nuc2-1* (with two or one *NUC1* gene), *nuc1-3* (with two or one *NUC2* gene) and *nuc1-3nuc2-1* double mutant plants. Right: WT and *nuc1-3* containing one *NUC2* gene plants grown on soil. **B)** Diagram of *NUC1* and *NUC2* genes from the ATG start to the TGA stop codon is shown. The black boxes correspond to exons separated by introns. The T-DNA insertion in the *NUC1* and *NUC2* mutant plants is indicated.

Supplemental Data. Durut et al. (2014). Plant Cell 10.1105/tpc.114.123893

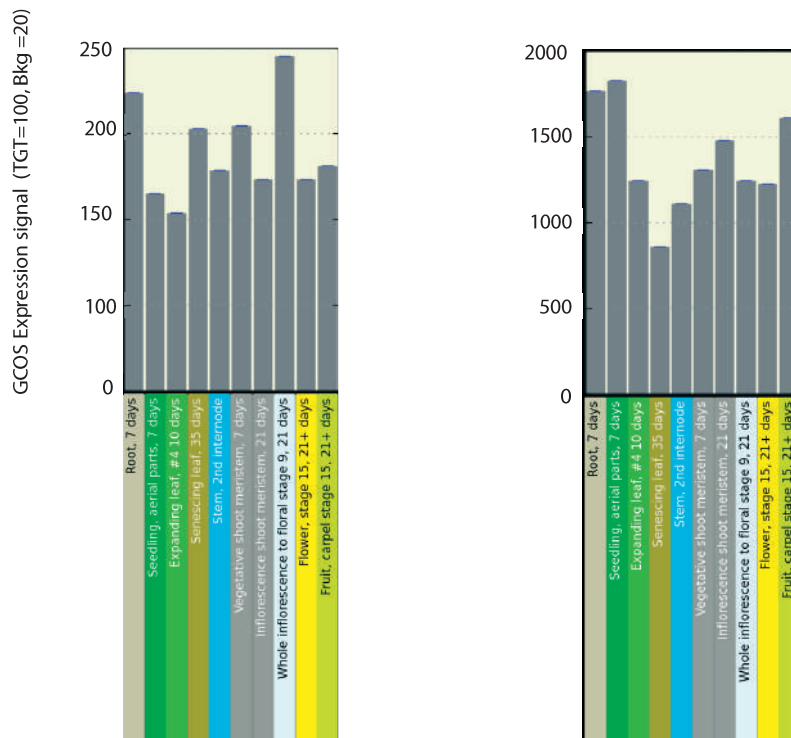


**Supplemental Figure 4:** RNAseq analysis of *nuc2-2* plants. List of up and down-regulated genes in *nuc2-2* mutant compared to WT plants. FLC (green) is highlighted. The graph shows expression of FLC in three WT and *nuc2-2* samples. The identification of At3g18610 (*NUC2*) among the up-regulated genes is due to the accumulation of truncated (upstream, but not downstream of the T-DNA insertion) and reversed transcripts originated from 35S promoter located in the LB border of the T-DNA insertion.

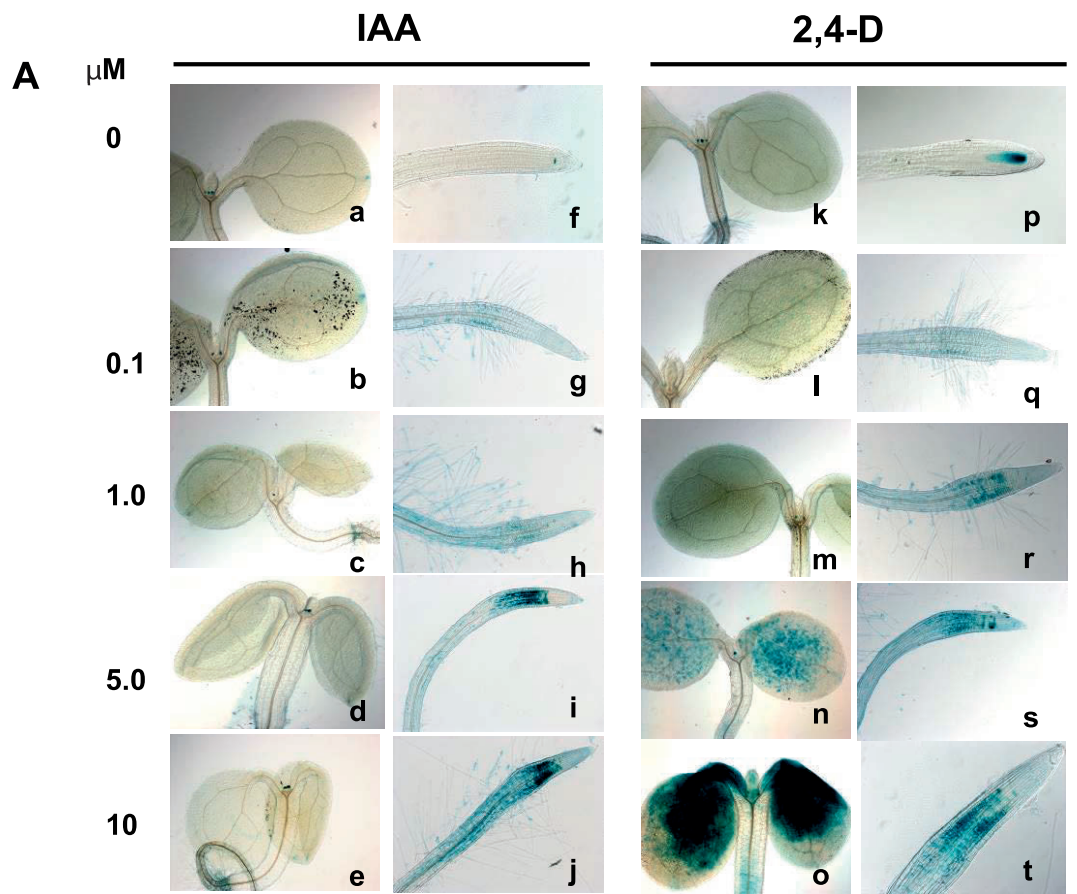
**A**



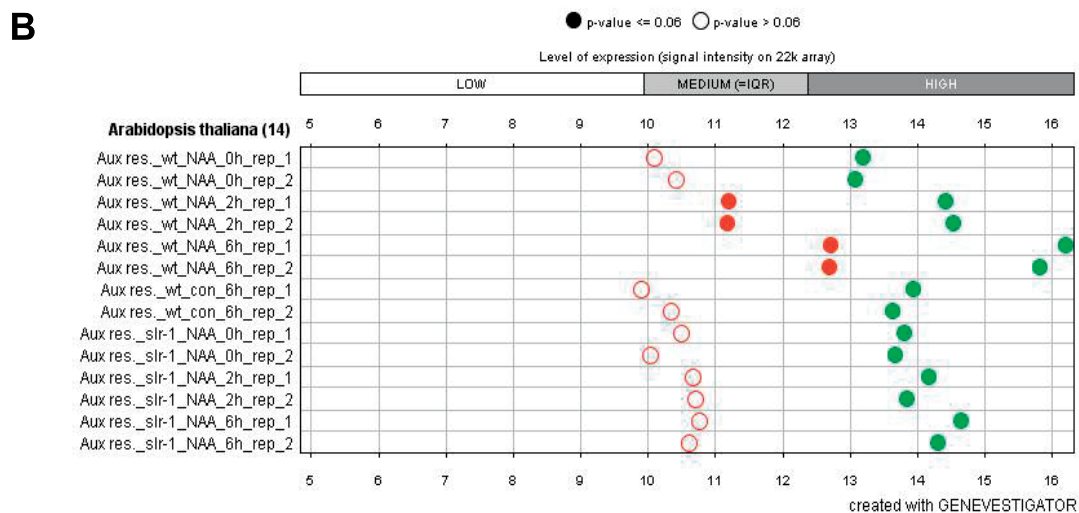
**B**



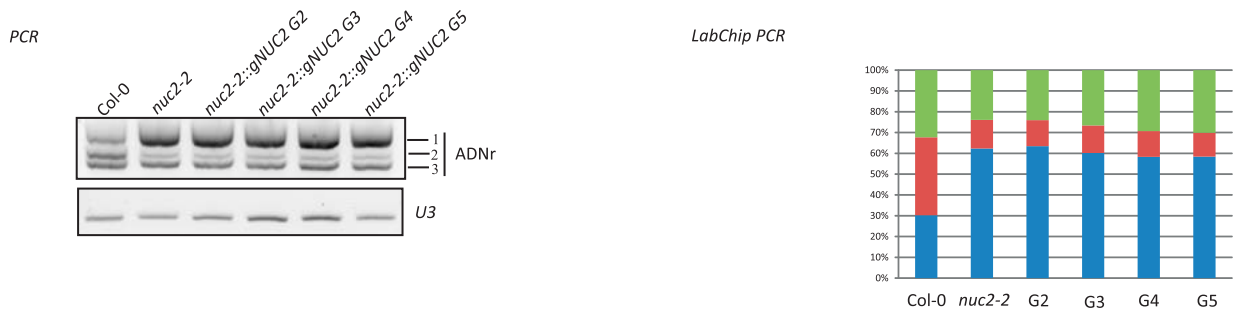
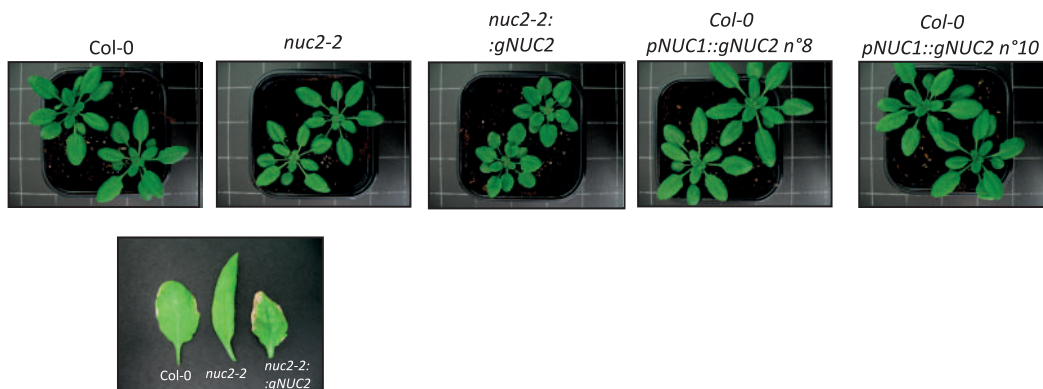
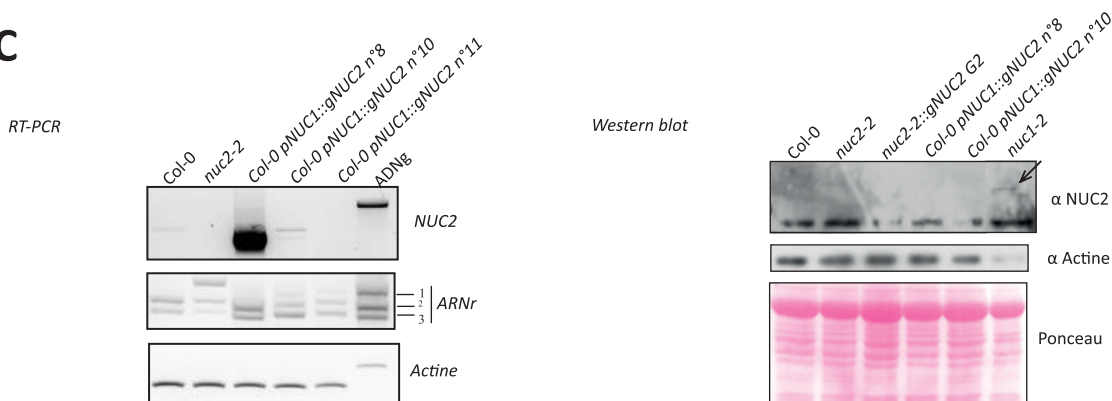
**Supplemental Figure 5:** Analysis *in silico* to compare relative expression level of *NUC1* and *NUC2* genes. Data were obtained from microarray available ([www.bar.utoronto.ca/welcome.htm](http://www.bar.utoronto.ca/welcome.htm) and [www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/)).



● AT3G18610 ● AT1G48920

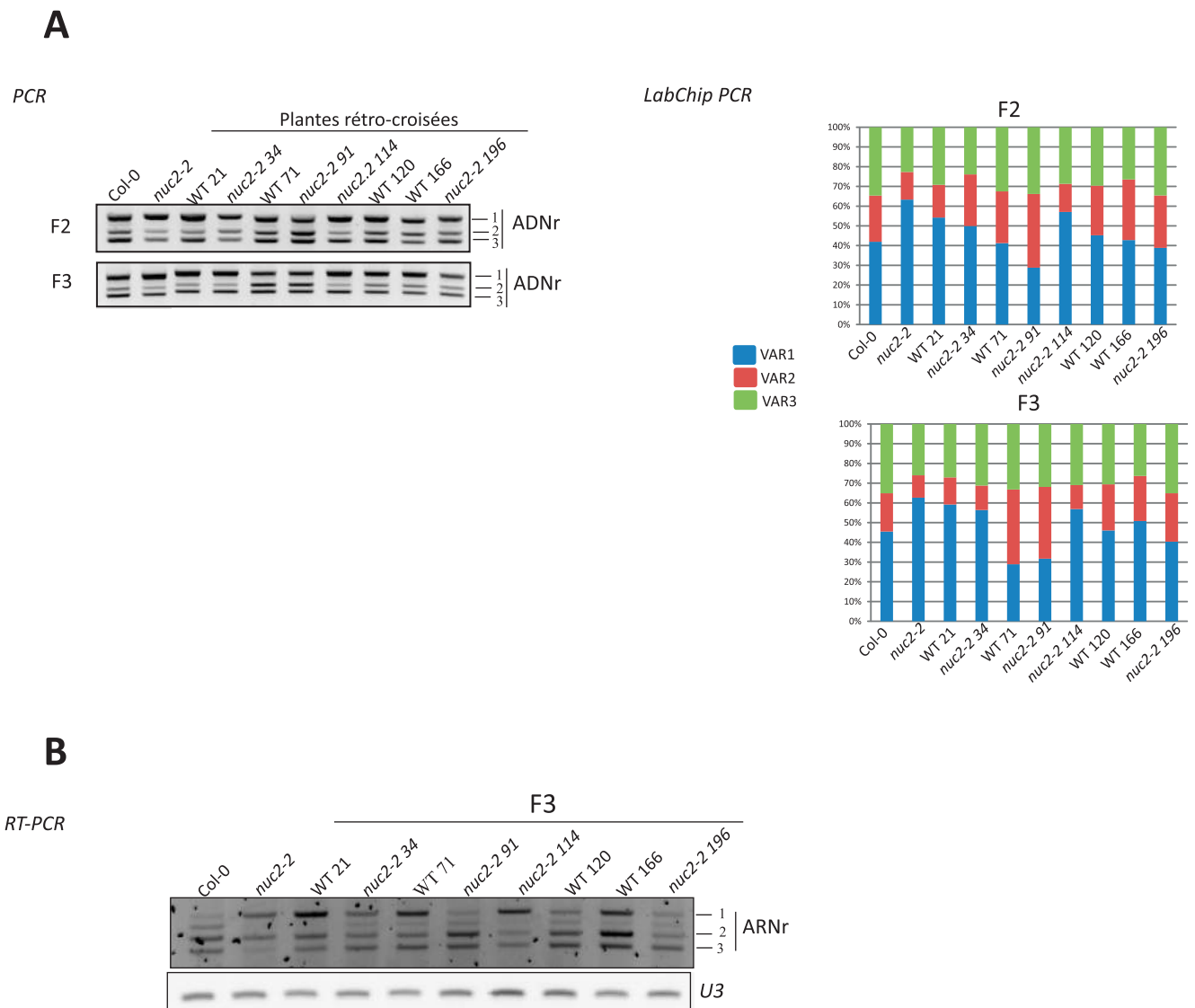


**Supplemental Figure 6: A)** Five day-old *A. thaliana* seedlings grown on Wattman/MS medium were transferred for 24h to MS liquid medium containing 0, 0.1, 1.0, 5.0 and 10  $\mu\text{M}$  of IAA (a-j) or 2,4 D (k-t). **B)** Analysis *in silico* to compare relative expression levels of *NUC1* (green dots) and *NUC2* (red dots) genes in response to auxin. Data were obtained from a microarray available on [www.genevestigator.com/gv/](http://www.genevestigator.com/gv/).

**A****B****C**

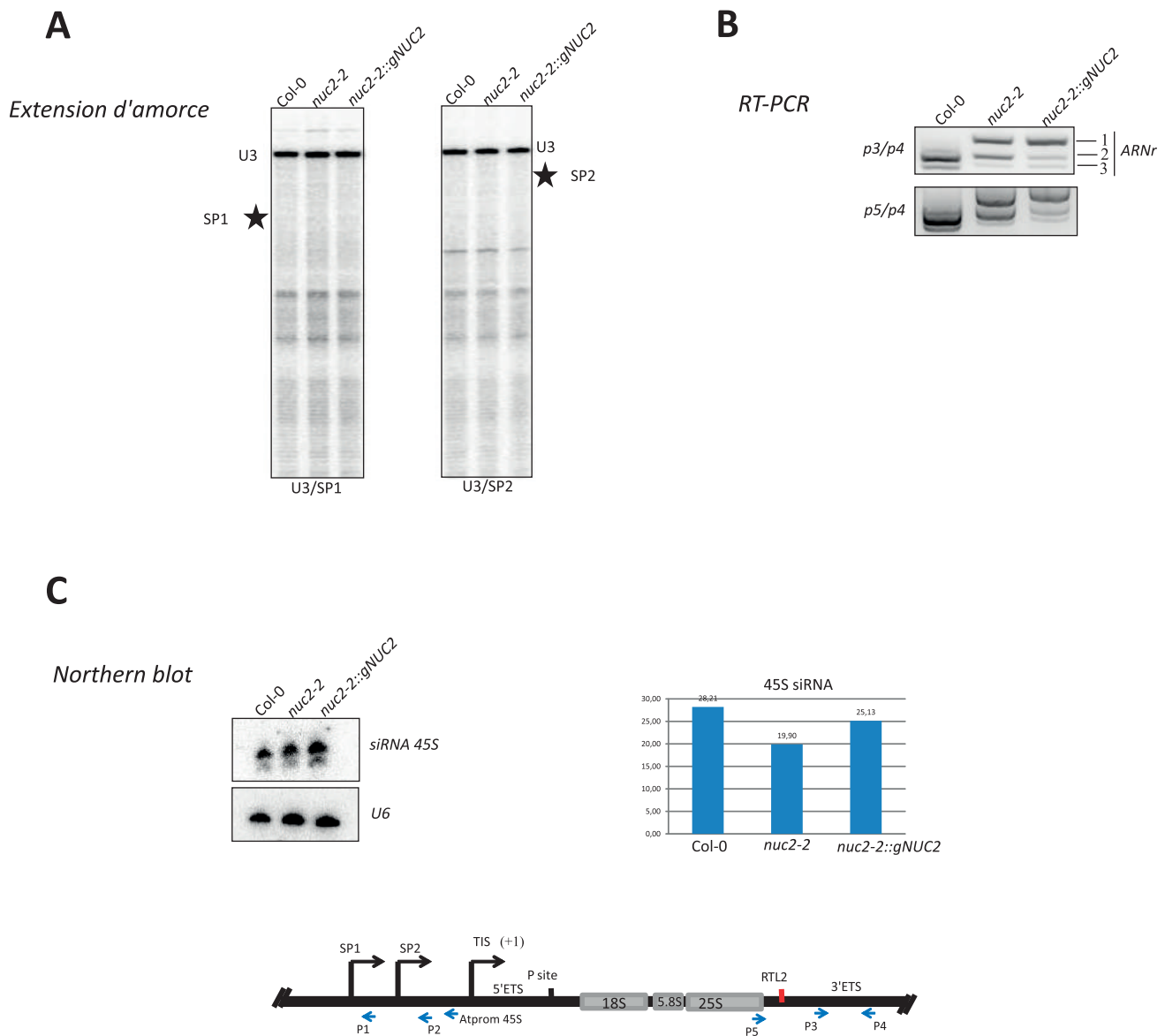
**Figure 19** : Analyse des plantes complémentées *nuc2-2::gNUC2* et des lignées sur expresseur de la *NUC2*

**A** : A gauche : Analyse PCR des gènes d'ARNr à l'aide des amorces 5'3ets/3'3ets à partir de plantules de 15j de *Col-0*, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* sur plusieurs générations (G2 à G5). L'amplification du gène *U3* est utilisée comme témoin de charge. A droite : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des variants VAR1 (bleu), VAR2 (rouge) et VAR3 (vert) dans les plantes *Col-0*, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* sur plusieurs générations (G2 à G5). L'histogramme a été obtenu suite à l'amplification de la région 3'ETS des ADNr et à la quantification de chacun des signaux à l'aide du système LabChip. **B** : Photographies de plantes de 4 semaines de *Col-0*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2* et *Col-0 pNUC1::gNUC2*. **C** : A gauche : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *NUC2* et d'ARNr dans les plantes de 15j de *Col-0*, *nuc2-2* et *Col-0 pNUC1::gNUC2*. L'amplification des transcrits *EF1α* est utilisée comme témoin de charge. A droite : Analyse par Western blot avec l'anticorps  $\alpha$ -*NUC2* dans les plantes de 15j de *Col-0*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *nuc1-2* et *Col-0 pNUC1::gNUC2*. La flèche indique la présence du signal correspondant à la protéine *NUC2*. L'anticorps actine et la coloration rouge ponceau sont utilisées comme témoin de charge.



**Figure 20** : Analyses des différentes générations de plantes rétro-croisées Col-0 x *nuc2*

**A** : A gauche : Analyse par amplification PCR des gènes d'ARNr à l'aide des amorces 5'3ets/3'3ets à partir de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et des différentes générations de plantes rétro-croisées (F2 et F3) *nuc2*/Col-0 (21, 34, 71 et 91) et Col-0/*nuc2* (114, 120, 166 et 196) redevenues sauvages (21, 71, 120 et 166) ou mutantes *nuc2* (34, 91, 114 et 196). A droite : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des variants VAR1 (bleu), VAR2 (rouge) et VAR3 (vert) dans les plantes Col-0, *nuc2-2*, *nuc2*/Col-0 et Col-0/*nuc2*. L'histogramme a été obtenu suite à l'amplification de la région 3'ETS des ADNr et à la quantification de chacun des signaux à l'aide du LabChip système. **B** : Analyse RT-PCR des gènes d'ARNr de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2*, *nuc2*/Col-0 et Col-0/*nuc2* en génération F3. L'amplification des transcrits *U3* est utilisée comme témoin de charge.



**Figure 21 :** Expression des gènes d'ARNr

**A :** Réaction d'extension d'amorce à partir d'ARN totaux de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* et des amorces *p1* (SP1) et *p2* (SP2). Les étoiles indiquent la taille attendue des transcrits générés à partir des promoteurs espaceurs SP1 et SP2. L'amorce U3 cible le U3 *snoRNA* et est utilisé comme témoin de charge. **B :** Analyse RT-PCR de l'expression des gènes d'ARNr à partir de plantules de 15j de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2* à l'aide des amorces *p3/p4* (5'3ets/3'3ets) et *p5/p4* (5'25S/3'3ets). **C :** Northern blot réalisé avec la sonde *At45Sprom*, ciblant le promoteur des ADNr, à partir d'extraits d'ARN totaux de Col-0, *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2*. L'histogramme représente la quantité de siRNA normalisée par rapport à U6.

Diagramme représentant une unité génique d'ADNr 45S avec les espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et la séquence codant les 3 ARNr (18S, 5.8S et 25S en gris). Les sites d'initiation de la transcription (TIS), les promoteurs espaceurs (SP1 et SP2) ainsi que les sites de maturation (P et RTL2) sont également représentés. Les amorces utilisées pour les réactions d'extension d'amorce, de RT-PCR et pour le Northern blot sont indiquées.

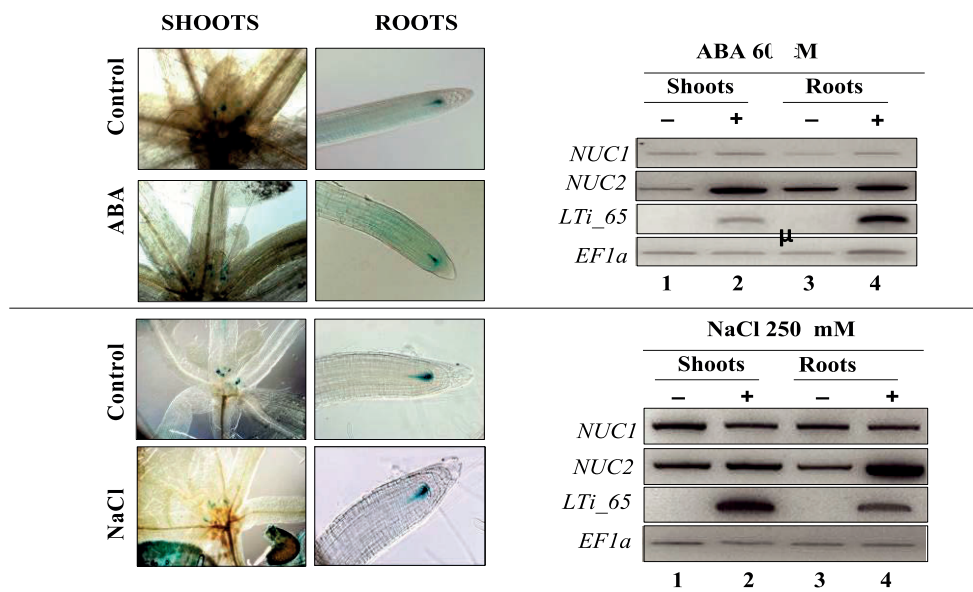


## Partie II : Le gène *NUC2* est induit en réponse au stress

---

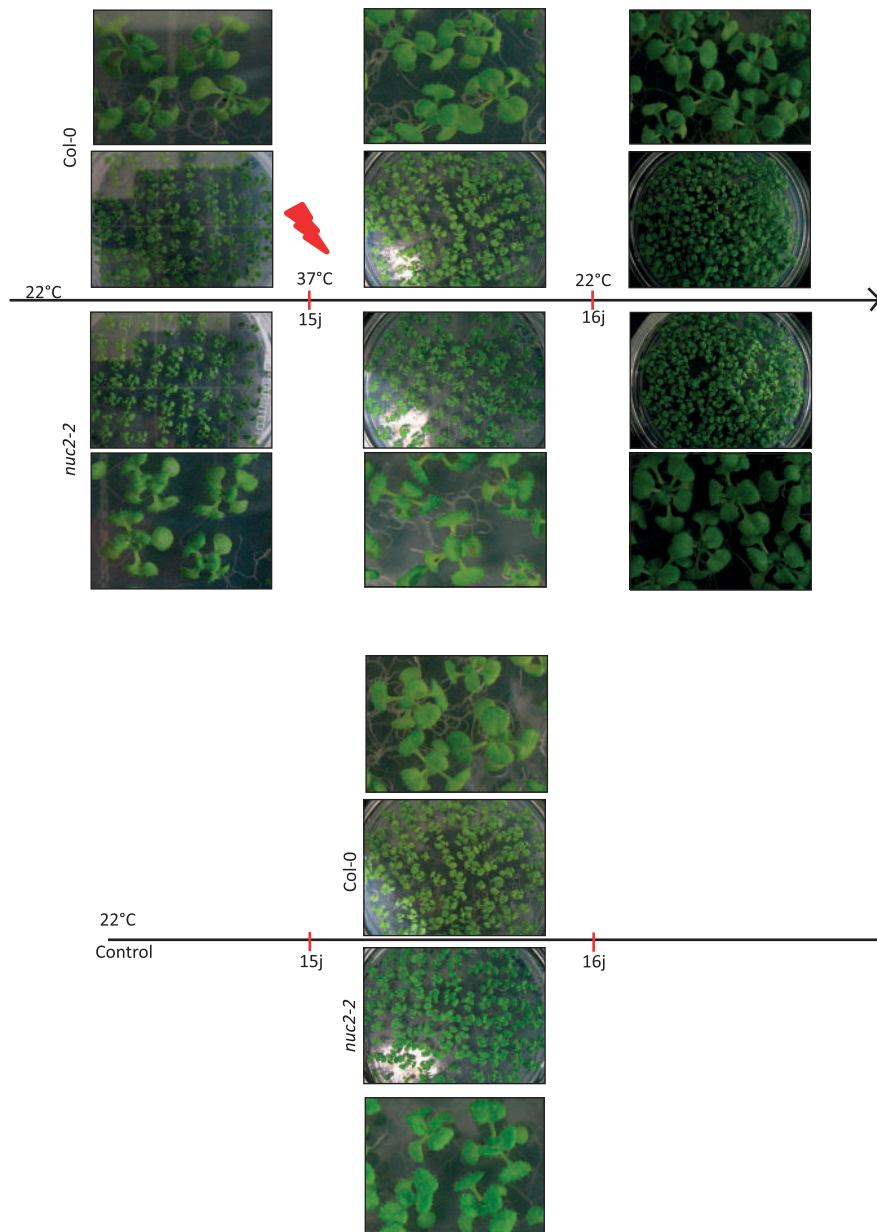
Deux gènes de la nucléoline ont été identifiés chez *A. thaliana* : *NUC1* et *NUC2*. Précédemment, nous avons montré que la protéine NUC2 est impliquée dans l'organisation chromatinienne des gènes d'ARNr. Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à mieux caractériser la fonction du gène *NUC2* au sein de la plante. Chez les animaux, la nucléoline est une protéine multifonctionnelle intervenant dans la régulation de plusieurs processus cellulaires notamment en réponse au stress (Daniely and Borowiec 2000; Daniely et al. 2002; Kim et al. 2005; Jiang et al. 2010a). Chez les plantes, des travaux ont mis en évidence la sur expression de la nucléoline en réponse à des changements environnementaux tels que la salinité, la gravité ou encore la lumière (Tong et al. 1997; Sobol et al. 2004; Jiang et al. 2010a; Sripinyowanich et al. 2013). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au potentiel rôle des protéines NUC1 et NUC2 dans la réponse au stress.

Au cours de ce travail, nous avons montré que le promoteur du gène *NUC2* est fortement induit en réponse au stress thermique et que cette induction est liée à la présence d'un élément *HSE* présent dans le promoteur du gène. Par ailleurs, des éléments de réponse à la sécheresse ou encore aux hormones, impliquées dans la voie de signalisation aux pathogènes, ont été identifiés dans le promoteur ce qui indique que le gène *NUC2* pourrait être impliqué dans la réponse à différents stress. De manière intéressante, ces éléments n'ont pas été détectés au sein du promoteur du gène *NUC1* ce qui pourrait suggérer l'apparition de potentielles nouvelles activités fonctionnelles au sein du gène dupliqué *NUC2*. L'ensemble de ces données est présenté sous la forme d'un article actuellement en cours de préparation.



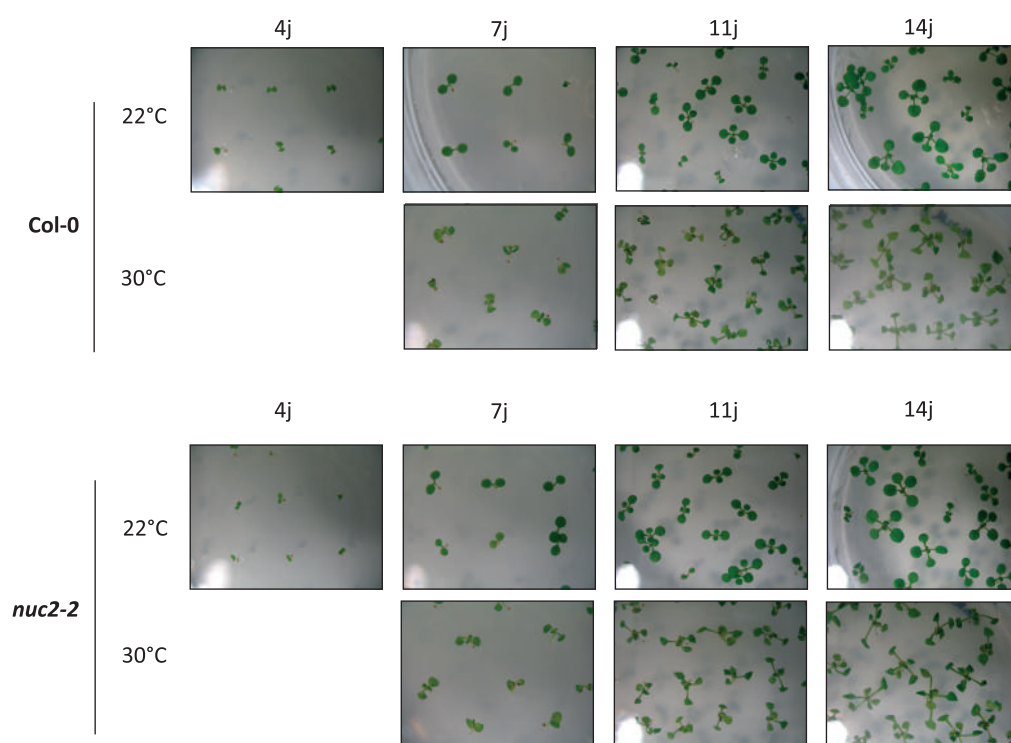
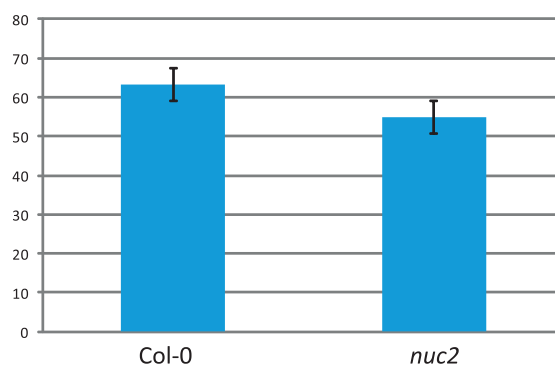
**Figure 2:** Expression of *NUC2* gene after NaCl and ABA treatments. 15 days old *A. thaliana* seedlings were treated for 4 hours with 60 μM ABA or 250 mM NaCl to study *NUC2* promoter activity and/or transcripts accumulation. Left panels: *NUC2* promoter activity after treatment with ABA or NaCl in shoots and roots. Right panels: RT-PCR analysis of *NUC1* and *NUC2* transcripts in shoots (Lanes 1 and 2) and roots (Lanes 3 and 4). The *pNUC2:GUS* construct is described in (Durut et al. 2014). Primers 5'*lTi65*/3'*lTi65* were used to amplify specific *LTI65* transcripts, which accumulate in response to ABA and NaCl treatments (Nordin et al. 1993). Amplification of *EF1α* transcripts was used as a PCR control to verify similar amount of cDNA in each sample.

In agreement with the presence of an *HSE cis*-element, the *NUC2* promoter activity is induced and transcripts accumulate in shoots and roots from plants treated 24h at 37° in darkness (Figure 3). qPCR analysis shows up to 8-fold increased amount of *NUC2* transcripts in roots from heat treated plants compared to control plants. In contrast and regardless of the presence of a potential *LTRE*, the *NUC2* promoter activity is not affected after 24h at 4°C. Only a slight reduction of *NUC2* transcripts is observed after the cold treatment.



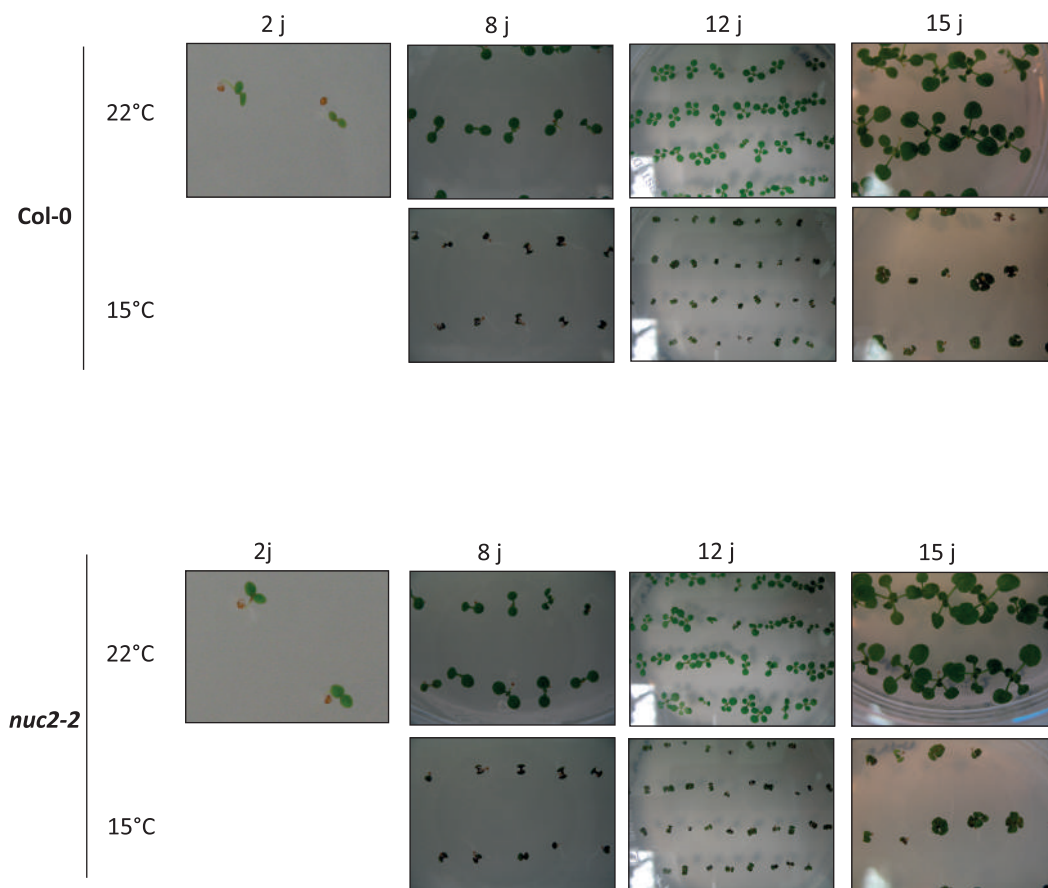
**Figure 22:** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 37°C

Photographies de plantules sauvages *Col-0* et mutantes *nuc2-2*. Les graines de plantes sauvages et mutantes sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 14 jours. Par la suite, les plantules sont placées à 37°C pendant 24 h puis replacées à 22°C. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle. La croissance des plantes à 22°C et 37°C est réalisée en lumière continue.

**A****B***Test de survie*

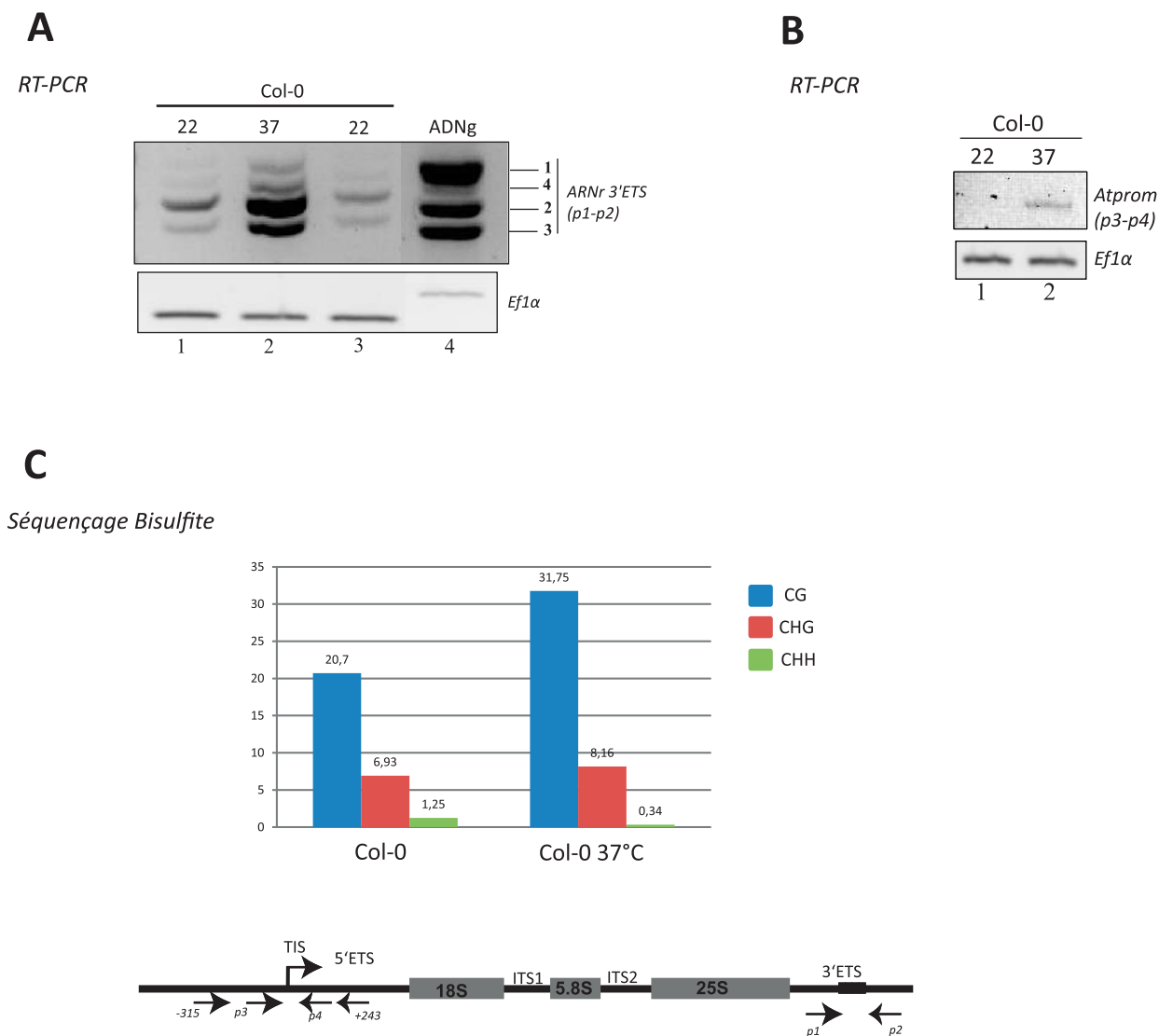
**Figure 23 :** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 30°C et test de survie

**A :** Photographies de plantules sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 4, 7, 11 et 14j. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 3 jours. Par la suite, les plantules sont transférées à 30°C pendant 10 jours. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle. **B :** Test de survie des plantes sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 35°C. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées 5j à 22°C. Par la suite, les plantules sont transférées à 35°C pendant 6j. Après 7j de retour à 22°C, le nombre de plantules ayant survécu au stress est comptabilisé.



**Figure 24:** Analyse phénotypique des mutants *nuc2-2* à 15°C

Photographies de plantules sauvages Col-0 et mutantes *nuc2-2* à 2, 8, 12 et 15j. Les graines de plantes sauvage et mutante sont semées sur milieu MS et placées à 22°C pendant 2 jours. Par la suite, les plantules sont transférées à 15°C pendant 12 jours. Des plantes sont laissées à 22°C pendant toute la durée du stress et sont utilisées comme contrôle.



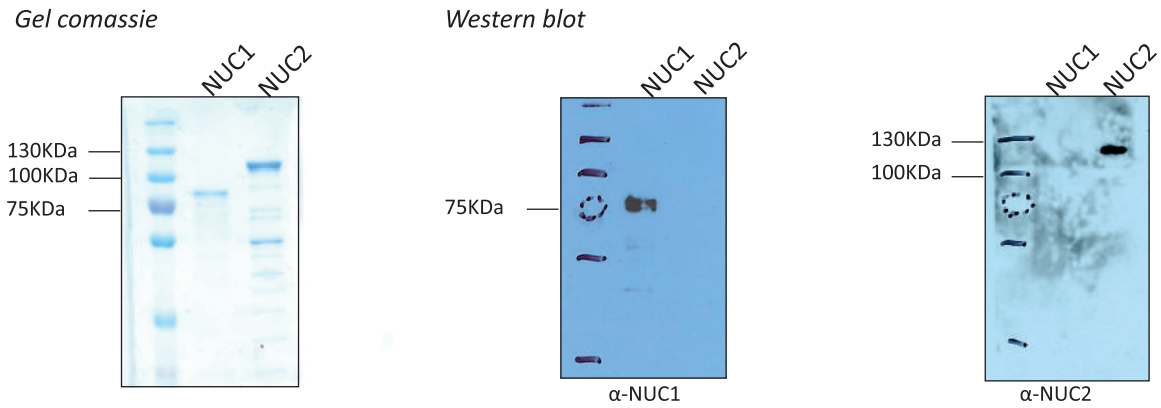
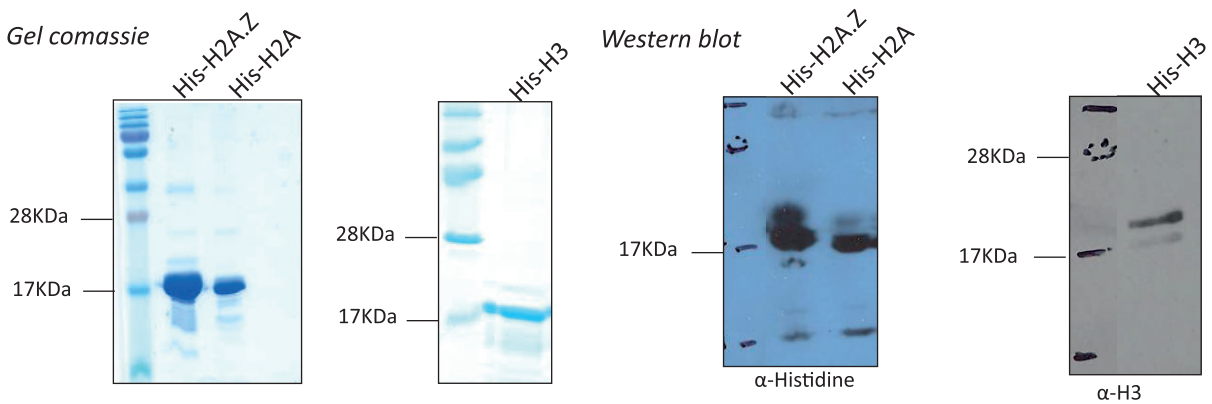
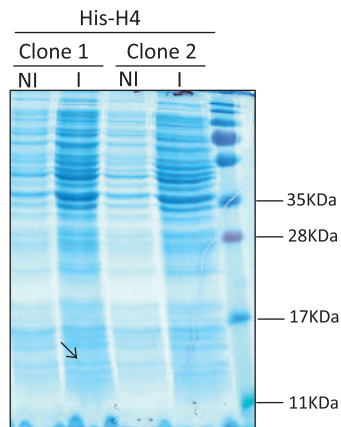
**Figure 26 :** Expression des gènes d'ARNr en réponse à la chaleur

Des graines de plantes sauvages Col-0 ont été semées sur milieu MS et transférées en chambre de culture pendant 15 jours dans des conditions standards de culture (lumière continue, 22°C). A 15j, les plantules sont mises à 37°C pendant 24 h puis transférées à nouveau à 22°C pendant 3 jours. **A** : Analyse de l'expression des gènes d'ARNr par RT-PCR à 22°C et à 37°C. Les amorces *p1/p2* (*5'3ets/3'3ets*) encadrant la région 3'ETS polymorphique permettent l'amplification des différentes formes de variantes. L'amplification du gène *EF1α* est utilisée comme témoin de charge. **B** : Analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits ARNr générés en amont du TIS à 22°C et à 37°C à l'aide des amorces *p3/p4* (*5'AtHind110/3'At5'ETS+228*). **C** : Séquençage bisulfite de la région promotrice-5'ETS des ADNr à l'aide des amorces *5'-315/3'+243*. L'histogramme présente le pourcentage de sites méthylés CG, CHG et CHH à température ambiante et à 37°C.

Diagramme représentant une unité génique 45S avec les espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et la séquence codant les trois ARNr (18S, 5.8S et 25S) séparés entre eux par des espaceurs internes (ITS1 et ITS2). Les amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR et de séquençage bisulfite sont également indiquées.

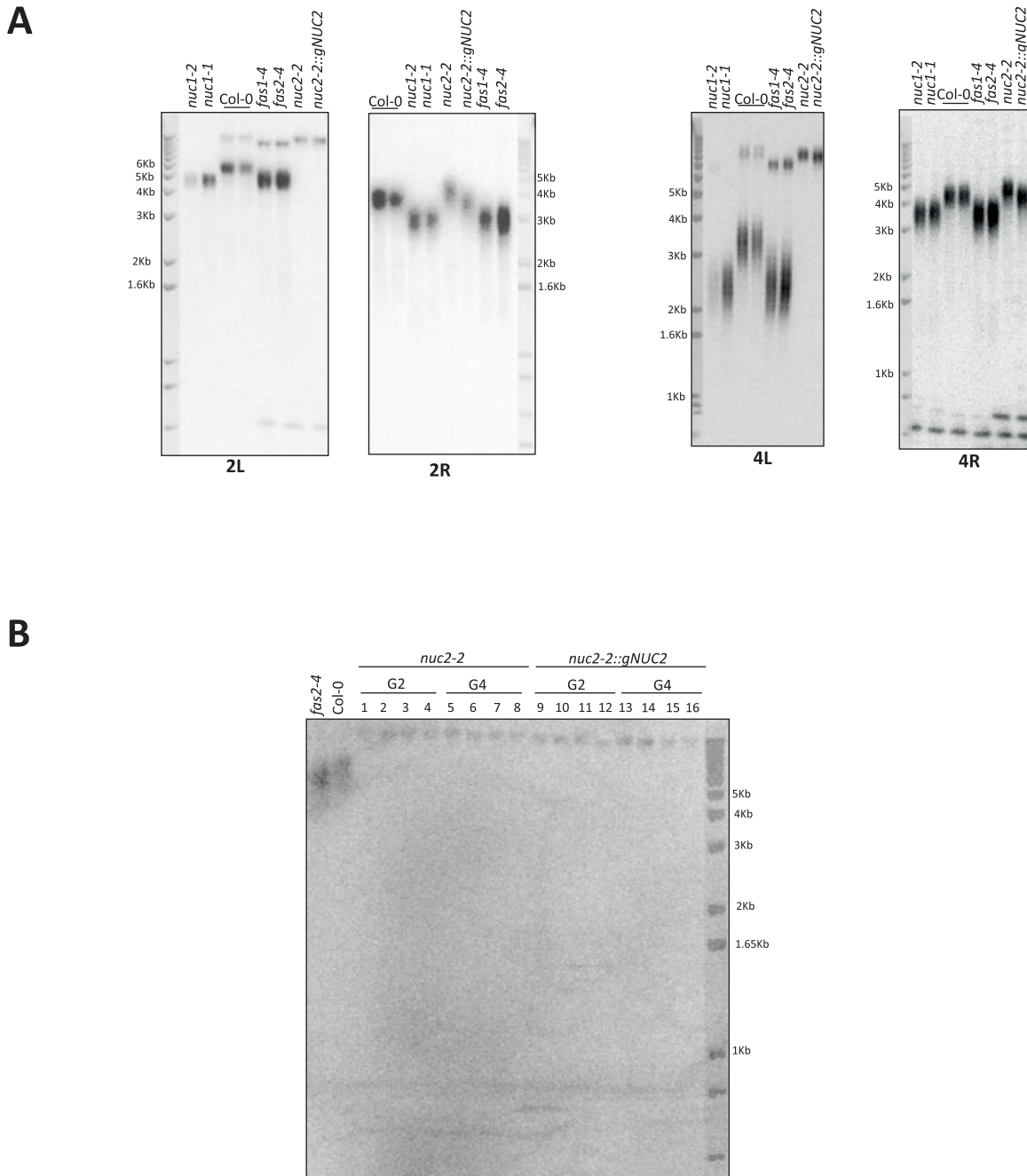
## Partie III : Résultats complémentaires

---

**A****B****C****Figure 27 :** Production des protéines recombinantes nucléoline et histone

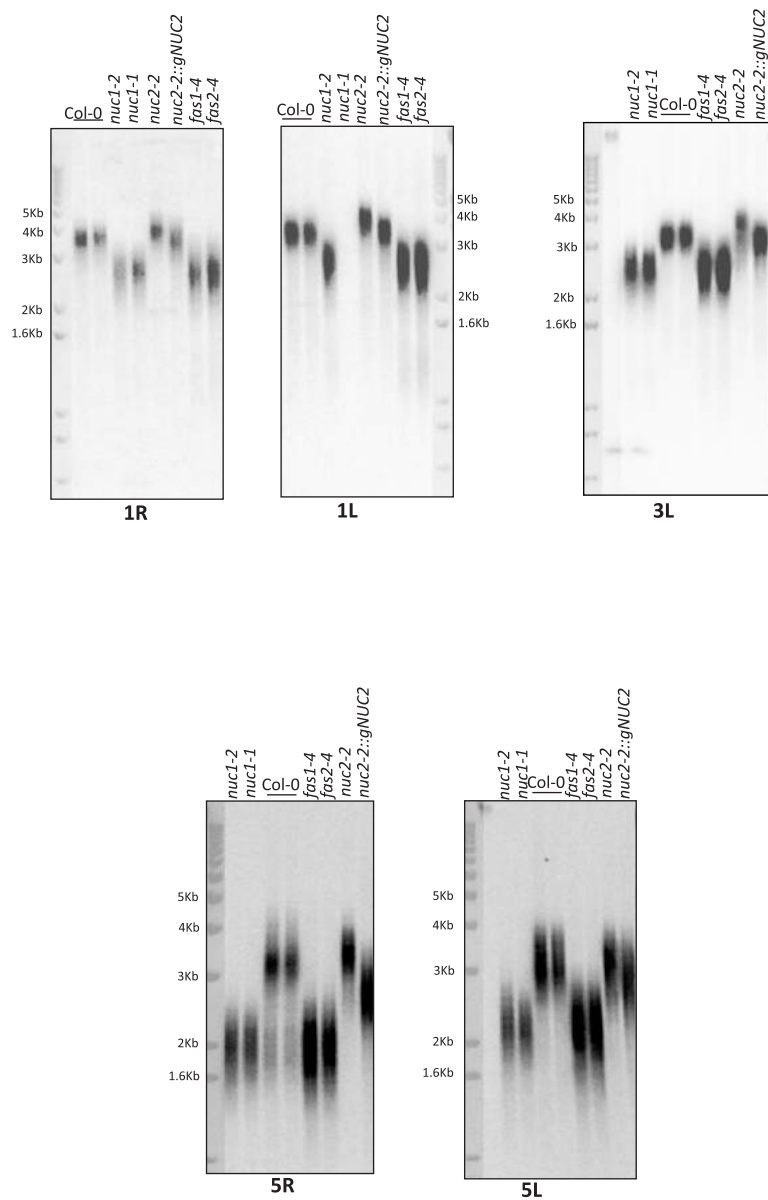
**A :** Production des protéines recombinantes NUC1 et NUC2. A gauche : Gel Coomassie suite à la purification des protéines His-NUC1 et His-NUC2. A droite : Analyse par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -NUC1 et  $\alpha$ -NUC2 des fractions purifiées des protéines NUC1 et NUC2. **B :** Production des protéines recombinantes histones. A gauche : Gel Coomassie suite à la purification des protéines His-H2A, His-H2A.Z et His-H3. A droite : Analyse par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -Histidine pour les protéines H2A et H2A.Z et  $\alpha$ -H3 pour la protéine H3. **C :** Gel Coomassie présentant les extraits bactériens avant et après induction avec 1 mM IPTG pour la protéine His-H4. Deux cultures issues de clones différents ont été analysées pour le construit H4. La flèche indique la taille attendue pour la protéine H4.





**Figure 31 :** Analyse de la longueur des télomères des chromosomes II et IV par la méthode PETRA

Analyse par Southern blot de la longueur des télomères des bras longs (2R et 4R) et courts (2L et 4L) des chromosomes II et IV : **A** : à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *nuc1-1*, *nuc1-2*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *fas1-4* et *fas1-2* et **B** : à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *fas1-2* et sur deux générations différentes de mutants *nuc2-2* et *nuc2-2::gNUC2*. La sonde ADN *TR4C* cible la région contenant les motifs répétés. La taille des fragments est déterminée à l'aide du marqueur moléculaire 1Kb+.



**Figure 32 :** Analyse de la longueur des télomères des chromosomes I, III et V par la méthode PETRA

Analyse par Southern blot de la longueur des télomères de chaque bras des chromosomes I, III et V à partir de feuilles de plantes de 4 semaines sauvages Col-0 et mutantes *nuc1-1*, *nuc1-2*, *nuc2-2*, *nuc2-2::gNUC2*, *fas1-4* et *fas1-2*. La sonde ADN *TR4C* cible la région contenant les motifs répétés. La taille des fragments est déterminée à l'aide du marqueur moléculaire 1Kb+.

# Discussion générale

---

# Matériels et Méthodes

---

# Références

---

## **Résumé**

Chez les eucaryotes, les gènes d'ARNr 45S sont présents en un grand nombre de copies organisées dans des régions chromosomiques appelées NOR pour « Nucleolus Organizer Region ». Cependant, seule une fraction de ces gènes est activement exprimée et leur activation/répression est majoritairement contrôlée par des mécanismes épigénétiques. Parmi les facteurs requis pour l'expression de ces gènes, se trouve la nucléoline, une protéine majeure du nucléole. Chez *A. thaliana*, la protéine NUC1 est nécessaire pour le maintien de la méthylation et le contrôle de l'expression de variants spécifiques des gènes d'ARNr. De manière intéressante, contrairement aux animaux et aux levures, le génome des plantes possède un deuxième gène codant la nucléoline : *NUC2*. Au cours de cette étude, nous avons montré que les deux gènes *NUC1* et *NUC2* sont nécessaires pour la survie de la plante. L'étude de plantes mutées pour le gène *NUC2* a révélé que cette protéine est impliquée dans l'organisation et l'expression des ADNr mais par des mécanismes antagonistes à ceux de son homologue *NUC1*. En effet, l'absence de la *NUC2* induit une hyperméthylation des ADNr ainsi qu'une réorganisation spatiale et une variation du nombre de copie des différents variants des gènes d'ARNr. Par ailleurs, la protéine *NUC1* se lie aux gènes actifs alors que la protéine *NUC2* est associée à la chromatine condensée en périphérie du nucléole. En parallèle, nous avons montré que l'expression des ADNr est affectée en réponse à la chaleur et que le gène *NUC2* est fortement induit. L'ensemble de ces données suggèrent un potentiel rôle de la *NUC2* dans la répression des gènes d'ARNr au cours du développement et en réponse au stress.

---

## **Abstract**

In eukaryotes, 45S rRNA genes are highly repeated and localize in chromosomal regions known as NOR for "Nucleolus Organizer Regions". However, only a small proportion of these genes is transcriptionally active and their activation and/or repression depends on epigenetic mechanisms. One of the factors involved in rDNA expression is nucleolin, a major nucleolar protein. In *A. thaliana*, nucleolin protein NUC1 is required to maintain rDNA methylation and control expression of specific rDNA variants. Interestingly, in contrast to animals and yeast, plants encode a second nucleolin gene: *NUC2*. Here, we show that *NUC1* and *NUC2* genes are both required for plant survival. Analysis of *nuc2* mutant plants reveals that *NUC2* protein is required for rDNA organization and expression but with mechanisms antagonistic to those described for its homologue *NUC1*. In fact, loss of *NUC2* induces rDNA hypermethylation and a spatial reorganization of rRNA genes with changes in copy numbers of rDNA variants. Moreover, *NUC1* protein binds transcriptionally active rRNA genes while *NUC2* protein associates with condensed chromatin in the periphery of the nucleolus. Furthermore, we show that rRNA gene expression is affected in response to heat shock and that the *NUC2* gene is strongly induced. Altogether, our results suggest a potential role of *NUC2* protein in rDNA repression during development and/or in response to stress.