



**HAL**  
open science

# Etude du rôle moléculaire de la protéine XPG dans la biogénèse des ribosomes

Florent Taupelet

► **To cite this version:**

Florent Taupelet. Etude du rôle moléculaire de la protéine XPG dans la biogénèse des ribosomes. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1019 . tel-03945627

**HAL Id: tel-03945627**

**<https://theses.hal.science/tel-03945627v1>**

Submitted on 18 Jan 2023

**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.



N°d'ordre NNT :  
2022LYSE1019

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Biologie moléculaire

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 18/02/2022, par :

**Florent Taupelet**

---

# **Étude du rôle moléculaire de la protéine XPG dans la biogénèse des ribosomes**

---

Devant le jury composé de :

Coin, Frédéric, DR, IGBMC, Université de Strasbourg **Rapporteur**  
Lengronne, Armelle, DR, IGH, Université de Montpellier **Rapporteuse et Présidente du jury**  
Mertani, Hichem, MCU, CRCL, Université Lyon 1 **Examineur**  
Giglia-Mari, Giuseppina, DR, INMG, Université Lyon 1 **Directrice de thèse**



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. F. FLEURY
Président du Conseil Académique	M. H. BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. D. REVEL
Vice-présidente de la Commission Formation	Mme C. BROCHIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. P. MIRONESCU
Directeur Générale des Services	M. P. ROLLAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Doyen : M. G. RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme D. SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

UFR Biosciences (Biologie, Biochimie)	Administratrice provisoire : Mme K. GIESELER
UFR FS (Chimie, Mathématique, Physique)	Directrice : Mme S. VIGUIER
Département Mécanique	Directeur : M. M. BUFFAT
Département Informatique	Directeur : M. B. SHARIAT
Génie Electrique des Procédés	Administratrice provisoire : Mme R. FERRIGNO
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. G. BODET
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme B. MEZIERE
Polytech Lyon	Directeur : M. E. PERRIN
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut national supérieur du Professorat et de l'Éducation	Directeur : M. P. CHAREYRON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

## RÉSUMÉS :

**Résumé en français :** Le vivant a besoin de préserver l'intégrité de son ADN, afin qu'il puisse être correctement transcrit par les ARN Polymérase. A ce titre, chez l'homme, il existe cinq grands systèmes de réparation de l'ADN, dont le système de réparation par excision de nucléotides (NER) qui répare notamment les lésions causées par le rayonnement UV. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce système, mais aussi dans d'autres processus de la cellule. Parmi ces protéines, XPG, codée par le gène *ERCC5*, est responsable de l'excision lors de la réparation par le NER. Une mutation d'*ERCC5* provoque le syndrome *Xeroderma Pigmentosum* de type G (XP-G) : les patients affectés ont une très forte prévalence des cancers de la peau, ainsi que des défauts cutanés et oculaires. Toutefois, certaines mutations d'*ERCC5* peuvent provoquer une combinaison d'XP-G et du syndrome de Cockayne (CS), qui cause de graves déficits du développement neuronal et une mort précoce. Il apparaît qu'un simple défaut de la réparation ne peut causer tous ces symptômes. XPG a été localisée dans le nucléole, où a lieu la biogénèse des ribosomes : l'ADN ribosomique (ADNr) est transcrit en ARN ribosomique (ARNr) 47S qui sera mûri pour former trois produits, l'ARNr 18S, 5.8S et 28S, qui entreront dans la composition des ribosomes, les usines à protéine de nos cellules. Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si la protéine XPG était impliquée dans la biogénèse des ribosomes, quels étaient ses rôles et s'ils pouvaient conduire à de nouvelles pistes thérapeutiques pour XP-G/CS.

**Titre en anglais :** Study of the molecular role of the XPG protein in ribosome biogenesis.

**Résumé en anglais :** To properly develop, living cells need to preserve DNA integrity to allow its transcription. To do so, human cells have developed five DNA repair systems. Among them, nucleotide excision repair (NER) repairs lesion caused by UV light. Many proteins are involved in this system, but also in other processes. XPG is in charge of the excision during NER. When its gene, *ERCC5*, is mutated, it causes the *Xeroderma Pigmentosum* type G (XP-G) syndrome: patients have a high prevalence of skin cancers, skin and ocular defects. However, some mutations of *ERCC5* provoke a combination of XP-G and Cockayne syndrome (CS), causing severe developmental defects and early death. A defect in NER only cannot explain these phenotypes. XPG has been located in the nucleolus, an organelle of the nucleus where ribosome biogenesis happens: ribosomal DNA (rDNA) is transcribed in 47S ribosomal RNA (rRNA) before being matured in three final products: rRNA 18S, 5.8S and 28S, components of the ribosomes, the cells' protein producers. In this context, we wanted to know if XPG protein is involved in this biogenesis, what are its roles and if it can bring new therapeutic leads for XP-G/CS.

**Discipline :** Biologie moléculaire

**Mots clés :** XPG ; *Xeroderma Pigmentosum* ; Syndrome de Cockayne ; ADN ribosomique ; ARN ribosomique ; Ribosomes ; R-loops ; ARN Polymérase 1

**Intitulé et adresse du laboratoire :** Institut NeuroMyogène (INMG),  
CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Claude Bernard Lyon 1,  
8 avenue de Rockefeller,  
69008 LYON

## REMERCIEMENTS :

En premier lieu, je tiens à remercier M. Frédéric COIN et Mme Armelle LENGRONNE qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et ont manifesté leur intérêt pour mon travail de thèse. J'espère que la lecture du présent travail vous plaira. Merci également à M. Hichem MERTANI qui a accepté d'être examinateur de mon travail de thèse.

Ensuite, merci à Ambra de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir d'abord aidé à obtenir le financement de la thèse, et ensuite à réaliser la thèse en question. Elle m'a beaucoup apporté sur le plan scientifique, et c'est également une personne très humaine. J'ai grandi en tant qu'homme et que scientifique durant ces trois ans, je me souviendrai avec tendresse de mon passage chez les MARI ! Merci également à Pierre-Olivier pour son apport scientifique ainsi que ses discussions un peu plus casual.

Merci à Leonardo, qui m'a énormément aidé pour la rédaction de ma thèse, et qui m'a beaucoup apporté scientifiquement en peu de temps. En plus d'être un excellent scientifique, c'est un super être humain. Merci beaucoup et bon courage pour la suite de tes projets !

Merci également aux membres de l'équipe, pour leur contributions diverses et variées, et pour leur aide précieuse et leur soutien au cours de cette thèse. Cœur sur Damien, mon frerot, mon pilier de cette aventure comme ils disent à la télé, je t'aime d'amour et tu le sais <3 Merci spécial à Charlène également, toujours de bonne humeur et prête à aider, scientifiquement ou non. Ces 3 années ou un peu moins en votre compagnie étaient fort plaisantes, et je vous souhaite une bonne continuation pour la suite !

Merci aux membres de l'INMG avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger, scientifiquement ou non, pour leur sympathie, et merci au service commun pour son travail d'arrache-pied qui facilite énormément la vie de tout le monde à l'Institut.

Merci à mes amis, en vrac : Linda et François, qui ont ramené la belote à Lyon, merci pour nos discussions toujours très rafraichissantes, bonne chance pour vos projets et on se revoit à l'Oktoberfest ! Merci également à Corentin et Florent, vous êtes là dans le cœur même si on se voit moins souvent.

Un merci très spécial à Sylvie Pomaret, que j'aie eue l'occasion de rencontrer à plusieurs reprises et dont la générosité m'a permis de réaliser cette thèse via le Prix qu'elle a contribué à créer à la Fondation pour la Recherche Médicale. Sans son action, je n'aurais jamais pu mener à bien ce projet et je ne la remercierai jamais assez pour m'avoir permis, comme elle l'a permis à d'autres, de réaliser un doctorat.

Merci à ma famille, en particulier mes parents et mes sœurs, mais aussi ma tante et ma grand-mère, sans oublier une pensée pour mon grand-père paternel et ma grand-mère maternelle ; ils ont toujours cru en moi et n'ont jamais cessé de me soutenir. C'est grâce à eux que je n'ai jamais rien lâché et si je me suis toujours battu pour ce que je voulais. Ils pourront se vanter d'avoir un docteur dans leur famille ;) Merci à ma belle-famille

également, en particulier Anthony et Sophie pour les Skype belote (ou belotes à Poitiers !) et pour Émilie aussi bien entendu.

Et enfin, merci à celle sans qui cette thèse n'aurait sans doute jamais eu lieu et qui me supporte depuis presque 4 ans et demi déjà, et pour de longues années encore ! Elle est un soutien sans faille, et une scientifique de qualité, qui réussira également une super thèse de l'autre-côté du Rhin j'en suis sûr ! Mes plus belles réussites ont été obtenues en grande partie grâce à elle. Cette thèse évidemment, mais aussi mes deux petites boules de poils préférées, que je mentionne même s'ils ne savent pas lire, entre (beaucoup) d'autres choses. Je t'aime et je te dédie ce travail. Merci.

## **LISTE DES PUBLICATIONS :**

### **Article 1 :**

**XPG role in ribosome biogenesis and R-loops removal in RNA polymerase 1 transcription.**

*Florent TAUPELET<sup>1</sup>, Lise-Marie DONNIO<sup>1</sup>, Charlène MAGNANI<sup>1</sup>, Pierre-Olivier MARI<sup>1</sup> and Giuseppina GIGLIA-MARI<sup>1\*</sup>*

1 : Institut NeuroMyogène (INMG), CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 avenue de Rockefeller, 69008 LYON

\* To whom correspondence and request for materials should be addressed.

G G-M:           PHONE : 04 26 68 82 63

EMAIL:           ambra.mari@univ-lyon1.fr

***En préparation***

## Table des matières :

LISTE DES FIGURES :	9
LISTE DES TABLEAUX :	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	10
INTRODUCTION :	13
I. La transcription par les ARN Polymérase	13
I.I L'ARN Polymérase 1	13
I.II La transcription par l'ARN Pol 2	19
I.III La transcription par l'ARN Polymérase 3	26
II. La biogénèse des ribosomes	30
II.I. Le nucléole et l'unité d'ADNr	30
II.II. Du pré-ARNr 47S aux formes matures	34
III. Les dommages à l'ADN et leur réparation	39
III.I. La réparation des cassures double brins	39
III.II. La réparation des lésions simple brin	41
IV. Les syndromes liés à un défaut du NER	45
IV.I. Xeroderma Pigmentosum	45
IV.II. Syndrome de Cockayne	46
IV.III. Trichothiodystrophie	48
V. La protéine XPG et ses différents rôles	50
V.I. XPG dans la réparation par excision de nucléotides	50
V.II. XPG et l'activité transcriptionnelle	52
V.III. Les autres rôles de la protéine XPG	52
BIBLIOGRAPHIE :	54
MATÉRIEL ET MÉTHODES :	78
RESULTS :	83
SUPPLEMENTARY MATERIALS :	95
BIBLIOGRAPHY :	104
DISCUSSION :	105
BIBLIOGRAPHIE :	115
CONCLUSION :	120

## LISTE DES FIGURES :

<b>Figure 1</b> : Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 1 .....	18
<b>Figure 2</b> : Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 2 .....	25
<b>Figure 3</b> : Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 3 .....	29
<b>Figure 4</b> : Schéma de l'organisation des gènes ribosomiques .....	31
<b>Figure 5</b> : Schéma de la structure des nucléoles .....	33
<b>Figure 6</b> : Schéma de la maturation des particules pré-40S .....	36
<b>Figure 7</b> : Schéma de la maturation des particules pré-60S .....	38
<b>Figure 8</b> : Les sources de lésions de l'ADN, le type de dommage induit et le système de réparation employé .....	40
<b>Figure 9</b> : Le mécanisme moléculaire du NER .....	44
<b>Figure 10</b> : La structure de la protéine XPG .....	51
<b>Figure 11</b> : Quantification of 47S pre-rRNA .....	84
<b>Figure 12</b> : Binding of UBF and RNAP1 on rDNA .....	86
<b>Figure 13</b> : R-loops along the rDNA .....	88
<b>Figure 14</b> : Maturation of the pre-rRNAs .....	90
<b>Figure 15</b> : Methylation of the mature rRNAs .....	92
<b>Figure 16</b> : Translational activity .....	94
<b>Supplementary Figure 1</b> : Structure of the XPG protein .....	98
<b>Supplementary Figure 2</b> : Comparison of the basal copy number of rDNA .....	99
<b>Supplementary Figure 3</b> : Northern blot with ITS2b, ITS2d/E and ITS1-5.8S probe .....	100
<b>Supplementary Figure 4</b> : Comparison of each methylation sites of the 5.8S rRNA .....	101
<b>Supplementary Figure 5</b> : Comparison of each methylation sites of the 28S rRNA .....	102
<b>Supplementary Figure 6</b> : Comparison of each methylation sites of the 28S rRNA .....	103

## LISTE DES TABLEAUX :

<b>Tableau 1</b> : Les sous-unités de l'ARN Polymérase 1 .....	14
<b>Tableau 2</b> : Les sous-unités de l'ARN Polymérase 2 .....	20
<b>Tableau 3</b> : Les sous-unités de l'ARN Polymérase 3 .....	28
<b>Tableau 4</b> : Récapitulatif des différents syndromes affectant la réparation de l'ADN .....	49
<b>Supplementary Table 1</b> : Sequences (5' to 3') of the probes used in RNA FISH analysis .....	95
<b>Supplementary Table 2</b> : Sequences (5' to 3') of the qPCR primers .....	96
<b>Supplementary Table 3</b> : Sequences (5' to 3') of the probes used for Northern Blot analysis .....	97

## LISTE DES ABRÉVIATIONS :

RNAPol1,2,3 : ARN Polymérase 1,2,3  
ADNr/rDNA : ADN ribosomique  
XP : *Xeroderma Pigmentosum*  
CS : Syndrome de Cockayne  
ARNr/rRNA : ARN ribosomique  
UPE : Séquence promoteur amont  
PIC : Complexe de pré-initiation  
TBP : Tata-binding Protéines  
TAF1S : Facteurs associés aux TBP spécifiques de la Pol 1  
SL1 : Facteur de sélectivité 1  
UBF : Facteur de liaison en amont  
UAF : Facteur d'activation en amont  
CF : Facteur core  
HMG : Groupe des protéines à haute mobilité  
TSS : Site du début de la transcription  
CSB/A : Protéine du syndrome de Cockayne B/A  
HMT : Histone méthyltransférase  
CK2 : Caséine Kinase 2  
WT5F : Facteur de transcription du syndrome de Williams  
NM1 : Myosine Nucléaire 1  
WRN : Hélicase du syndrome de Werner  
PTRF : Facteur de libération de Pol 1 et du transcrit  
TTF-1 : Facteur de terminaison spécifique de la transcription Pol 1  
ARNm/mRNA : ARN messenger  
ARNsn/snRNA : Petits ARN nucléaires  
miARN : Micro ARN  
GTF : Facteurs de transcription généraux  
NELF : Facteur d'élongation négative  
DSIF : Facteur induisant la sensibilité à DRB  
P-TEFb : Facteur d'élongation positive b  
PAS : Signal de polyadénylation  
CPA : Complexe de clivage et polyadénylation  
CPSF : Cleavage and polyadenylation specificity factor  
PAPBN1 : Poly(A)-binding protein nuclear 1  
PROMPTs : Transcrits en amont du promoteur  
SRP1 : Particule de reconnaissance du signal  
RPR1 : RNase P  
ARNt/tRNA : ARN de transfert  
NLS : Signal de localisation nucléaire  
NRE : Signal de rétention nucléaire  
Rps : Protéines de la petite sous-unité ribosomique  
Rpl : Protéines de la grande sous-unité ribosomique  
NOR : Région organisatrice du nucléole  
IGS : InterGenic Spacer  
ETS : External Transcribed Spacer  
ITS1/2 : Internal Transcribed Spacer 1/2

CG : Composant granulaire  
 CFD : Composant fibrillaire dense  
 CF : Centre fibrillaire  
 FBL : Fibrillarine  
 PNB : Corps prénucléolaire  
 DSB/DSBR : Cassure double brin  
 AF : Facteur d'assemblage des ribosomes  
 snoRNA : Petit ARN nucléolaire  
 Drs : Déficience en sous-unités ribosomiques  
 Nop : Protéines nucléolaires  
 Mak : Maintenance d'un plasmide tueur  
 Rrp : Maturation de l'ARN ribosomique  
 Kre : Résistance à un tueur  
 Ecm : Matrice extracellulaire  
 Spb : Suppresseur de Pab  
 PARN : Ribonucléase spécifique des poly(A)  
 PAPD5 : Polymérase poly(A)  
 TUTase : Terminale uridyle transférase  
 ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène  
 UV : Lumière ultraviolette  
 SSB : Cassure simple brin  
 6-4PP : Dimère 6-4 pyrimidine-pyrimidone  
 CPD : Dimère cyclobutane pyrimidine  
 ICL : Réticulation inter-brins  
 BER : Réparation par excision de base  
 NER : Réparation par excision de nucléotides  
 HR : Recombinaison homologue  
 NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues  
 MMR : Réparation des mésappariements  
 DNA-PKcs : Protéine kinase ADN-dépendante  
 CDR : Région déterminant la complémentarité  
 SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing  
 BIR : Réplication induite par une cassure  
 TA-HRR : Recombinaison homologue associée à la transcription  
 GGR : Réparation du génome global  
 TCR : Réparation couplée à la transcription  
 CAK : Kinase associée aux cyclines  
 CDK7 : Kinase dépendant des cyclines 7  
 MAT1 : Menage a trois 1  
 COFS : Syndrome Cérébro-Oculo-Facio-Squelettique  
 UVSS : Syndrome UV-Sensitif  
 TTD : Trichothiodystrophie  
 XPV : Variant du *Xeroderma Pigmentosum*  
 UDS : Synthèse d'ADN non-programmée  
 XP/CS : *Xeroderma Pigmentosum* combiné au syndrome de Cockayne  
 RRS : Récupération de la synthèse d'ARN  
 BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau  
 TTDP : Trichothiodystrophie photosensible

TTDN : Trichothiodystrophie non photosensible  
AA : Acide aminé  
FEN-1 : Flap Endonucléase 1  
UBM : Domaine de liaison à l'ubiquitine  
PIP : Domaine d'interaction avec PCNA  
CTD : Domaine C-terminal  
MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium  
RNA FISH : RNA Fluorescence Hybridization In Situ  
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine  
DRIP : DNA:RNA Immunoprecipitation  
qPCR : PCR quantitative  
SUnSET : Surface Sensing in Translation  
RAMP : Ratio Analysis of Multiple Precursors  
PTP : Primary Transcript Plus  
2'-O-Me : 2'-O-Méthylation  
A : Aminoacyl-site  
P : Peptidyl-site  
E : Exit-site  
DLFT : Dégénérescence lombaire fronto-temporale  
AOA2 : Apraxie oculomotrice de type 2  
SETX : Senataxine  
FA : Anémie de Fanconi  
DEB : Diepoxybutane B  
MMC : Mitomycine C  
sincRNA : ARN intergénique sens non-codant  
siARN : Petit ARN interférent

## INTRODUCTION :

L'ADN est le support de notre information génétique. Pour pouvoir exprimer cette information, il doit être transcrit en ARN par des enzymes spécialisées, les ARN Polymérase. Selon le type d'ARN codé par un gène, c'est une Polymérase ARN (RNAPol) différente qui sera responsable de la transcription. Les trois polymérase principales chez l'homme sont la Polymérase ARN 1, la Polymérase ARN 2 et la Polymérase ARN 3. L'ARN polymérase 1 transcrit notamment les gènes ribosomiques (ADNr), première étape du processus de la biogénèse des ribosomes, les usines à protéines de notre cellule. Si l'ADN subit des dommages, sa réplication ou sa transcription peuvent être mises en péril, et par extension la viabilité cellulaire avec elles. Afin d'éviter des conséquences délétères, notre cellule a mis en place différents systèmes de réparation, au nombre de cinq. De très nombreuses protéines sont impliquées dans ces systèmes de réparation, parfois même dans plusieurs d'entre eux, et parfois même dans d'autres processus, comme par exemple la transcription. La mutation des gènes codant pour ces protéines provoque des syndromes dérivant d'une incapacité à réparer certaines lésions. Toutefois, dans certains cas, les symptômes observés ne peuvent pas être expliqués par la seule perturbation des processus de réparation. Parmi ces protéines aux rôles multiples, on trouve la protéine XPG, codée par le gène *ERCC5*. Certaines des mutations de ce gène provoquent une combinaison du *Xeroderma Pigmentosum* (XP) et du Syndrome de Cockayne (CS), deux syndromes de la réparation. Impliquée dans le système de réparation par excision de nucléotides, ainsi que dans la réparation par excision de bases ou la recombinaison homologue, elle a également été trouvée en complexe avec la machinerie transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 2. XPG a aussi été localisée dans le nucléole, lieu critique pour la biogénèse des ribosomes, les machineries cellulaires qui catalysent la production des protéines. Nous allons dans ce travail de thèse nous intéresser aux rôles potentiels de la protéine XPG dans cette organelle. En effet, le syndrome multifactoriel *Xeroderma Pigmentosum* – Syndrome de Cockayne ne peut être causé par le seul défaut des mécanismes de réparation, et d'autres processus cellulaires doivent être mis en cause, notamment la biogénèse des ribosomes.

### I. La transcription par les ARN Polymérase

#### I.I L'ARN Polymérase 1

L'ARN Polymérase I (RNAPol1) est l'une des trois polymérase majeures chez l'homme, composée de plusieurs sous-unités (Tableau 1). Elle supervise la transcription des ADN ribosomiques en ARN ribosomiques (ARNr), à l'exception de l'ARNr 5S. Pour ce faire, elle est accompagnée par de nombreux facteurs de transcriptions. La production des ARN ribosomiques représente l'immense majorité de la transcription d'une cellule : dans certaines conditions, près de 60% de l'activité transcriptionnelle totale d'une cellule est constituée par l'activité de la RNAPol1 (1).

Sous-unité	Gène codant pour la sous-unité	Poids (kDa)
RPA1	POLR1A	195
RPA2	POLR1B	128
RPAC1	POLR1C	39
RPAC2	POLR1D	15
RPA49	POLR1E	47
RPA43	POLR1F	37
RPA34	POLR1G	55
RPA12	POLR1H	14

**Tableau 1** : *Les sous-unités de l'ARN Polymérase 1.*

### *1.1.1 Initiation de la transcription*

Une séquence promotrice spécifique est indispensable à l'initiation de la transcription par la Pol 1. Composée de 140 à 160 pb chez les vertébrés et les levures, cette séquence est cependant très peu conservée d'une espèce à une autre, attestant de la grande spécificité de la machinerie transcriptionnelle de la Pol 1 (2). Cependant, en règle générale, la séquence promotrice peut être divisée en deux séquences distinctes : la séquence Core, et une séquence promoteur amont (UPE). Cette division de la séquence promotrice est cruciale *in vivo*, mais *in vitro*, la séquence Core est souvent suffisante pour une initiation correcte. En premier, un complexe de pré-initiation se forme (PIC). Il est constitué de protéines se liant à la boîte TATA (TBP) et de facteurs associés à ces TBP, spécifiques de la Pol 1 (TAF1S). Chez les mammifères, le facteur de sélectivité 1 (SL1) est indispensable pour former le complexe de pré-initiation. SL1 contient TBP ainsi que cinq TAF1S, TAF110,68,48,41 et 12 (3). Le facteur de liaison en amont, ou UBF, améliore grandement la transcription par la Pol 1. Chez la levure, deux facteurs sont requis pour la formation du PIC : le facteur d'activation en amont (UAF) et le facteur core (CF). Le CF a une contrepartie qu'on retrouve chez les mammifères (4). UAF est en revanche spécifique de la levure (5).

Une cellule somatique comporte plusieurs centaines de copies d'ADNr, dont seulement une partie est transcrite. Le niveau de liaison d'UBF reflète le nombre de gènes actifs (6). UBF est une protéine qui appartient au groupe des protéines à haute mobilité (HMG). Elle se compose de deux polypeptides, UBF1 et UBF2, qui sont formés par un épissage alternatif d'un seul transcrit (7) et peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. UBF1 permet une activité transcriptionnelle élevée de la Pol 1, tandis qu'UBF2 est cinq fois moins actif (8). Pour fonctionner, UBF se repose sur ses multiples séquences HMG afin de former l'enhancesome, une structure proche du nucléosome capable de réguler la transcription des gènes ribosomiques (9). UBF joue de nombreux autres rôles, tels que le recrutement du facteur de sélectivité 1 (10), mais aussi la régulation de l'échappement du promoteur (11) ou la phase d'élongation de la transcription (12). De plus, UBF n'est pas seulement capable de se lier au promoteur de l'ADN ribosomique *in vivo* : il est retrouvé tout le long des séquences transcrites, et même au niveau des séquences intergéniques qui flanquent les régions codantes (13). Enfin, UBF permet une conformation chromatiniennne favorable à la transcription (14).

SL1 reconnaît deux séquences sur chaque unité de rDNA : une première qui contribue à la formation de l'ARNr 47S, et une seconde généralement appelée promoteur « Spacer » (15,16). SL1 recrute ensuite le facteur TIF-1A (Rrn3 chez la levure) (17,18), qui permet la transition vers la suite du processus transcriptionnel. En effet, TIF-1A stabilise la Pol 1 dans sa forme monomérique, compétente transcriptionnellement, en opposition à la Pol 1 libre qui adopte plutôt une structure dimérique et inactive (19).

De manière intéressante, pour assurer une initiation correcte de la transcription, le facteur de terminaison spécifique de la transcription Pol 1, TTF-1, doit être liée au site T<sub>0</sub>, situé à proximité du site de début de la transcription (TSS), afin de permettre le remodelage des nucléosomes via hydrolyse de l'ATP (20). TTF-1 interagit notamment avec TIP5, une sous-unité du complexe NoRC, qui permet le remodelage de la chromatine (21). NoRC contribue à la répression de la transcription des rDNA, en interagissant avec HDAC1 pour désacétyler les histones (22) et en recrutant des DNA méthyltransférases, contribuant à la formation d'hétérochromatine et donc à la répression de l'expression des gènes ribosomiques (23). TTF-1 permet également le recrutement de CSB, qui est nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation (24). Enfin, CSB interagit avec l'histone méthyltransférase (HMT) G9a, qui

méthyle les histones H3 sur la lysine 9. L'action de cette HMT est importante pour la transcription des ADNr.

### *1.1.2 La phase d'élongation*

Une fois le PIC formé, la Pol 1 doit s'échapper du promoteur pour transcrire activement les gènes ribosomiques (11). Cet échappement est l'étape limitante de la synthèse d'ARNr in vitro (25). L'échappement du promoteur coïncide avec la libération de TIF-1A du promoteur, une libération indispensable à la bonne progression de la transcription mais aussi du cycle cellulaire chez la souris (26). La caséine kinase 2 (CK2) phosphoryle deux sérines spécifiques de RRN3 afin de permettre sa libération de la polymérase (26).

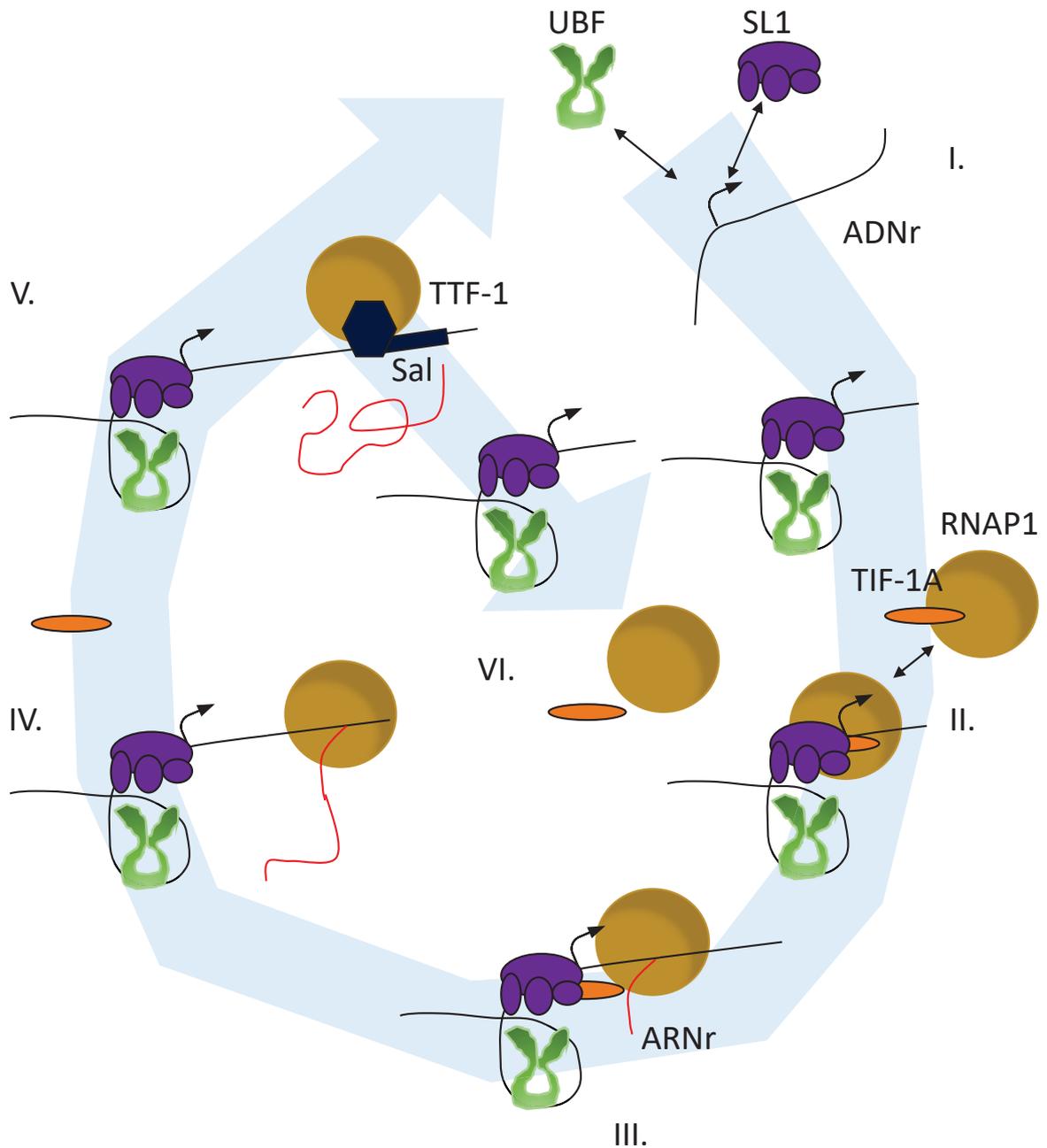
UBF est également un acteur majeur de l'échappement du promoteur (27). Il interagit avec l'hétérodimère PAF49/CAST-PAF53, spécifique de la Pol 1 humaine, et permet l'activation transcriptionnelle (28). Ces deux événements permettent la transition vers une élongation active de la RNAP1. Cette dernière est une enzyme extrêmement active : en moyenne, 100 polymérases transcrivent chaque copie active des gènes au rythme effréné de 95 nucléotides par seconde (29). Parmi les facteurs nécessaires, l'inévitable UBF, qui permet un remodelage phosphorylation-dépendent de la chromatine (9,13). SL1 semble également permettre une conformation spatiale favorable à la production d'ARNr en rapprochant les régions Core, UPE, et terminales (30). D'autres facteurs sont impliqués : les chaperonnes d'histones nucléoline, nucléophosmine et FACT. La première facilite la transcription à travers la chromatine (31), la seconde est liée aux histones au niveau des gènes ribosomiques et son absence inhibe la transcription (32), tandis que la troisième, dont le nom est littéralement « facilite la transcription de la chromatine », a plusieurs de ses sous-unités qui co-précipitent avec l'ARN Pol 1 (33). Les liens entre les facteurs chromatiniens et la transcription par l'ARN Pol 1 sont également renforcés par le fait que le facteur de transcription du syndrome de Williams (WTSF)-SNF2h facilite la transcription (34). Les moteurs moléculaires myosine nucléaire 1 (NM1) et actine nucléaire 1 participent également à l'élongation par la Pol 1 (34,35). Ces deux moteurs moléculaires sont également impliqués dans le déplacement de l'ARN Pol 1 à la périphérie du nucléole au cours de la réparation par le TC-NER (36).

Des topoisomérases, telles que la topoisomérase I qui est associée à la Pol 1 dans des cellules murines (37), participent également à faciliter l'élongation en soulageant les super enroulements précédant et suivant la Pol 1. CK2 phosphoryle également la topoisomérase II $\alpha$ , une sous-unité de la Pol I $\beta$ . En outre, des protéines de la réparation de l'ADN semblent également impliquées dans la transcription Pol 1 : par exemple, le complexe TFIIH, si important pour la réparation par le NER mais aussi la transcription des ARNm par la Pol 2, est recruté au cours de la transcription (38). Il alimente la transcription au travers de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de sa sous-unité XPB. La protéine CSB, impliquée dans la phase de détection du TC-NER, a également été localisée en complexe avec la Pol 1, XPG et TFIIH (39). L'hélicase du syndrome de Werner (WRN) accélère la transcription par l'ARN Pol 1 (40). Gadd45a, la protéine de l'arrêt de croissance et des dommages à l'ADN, est recrutée avec le complexe de la réparation par excision de nucléotides au niveau du promoteur des gènes ribosomiques par TAF12. Ceci conduit à une déméthylation active, permettant la transcription de l'ADN ribosomique (41). La transcription par la Pol 1 est intimement liée à la maturation du produit de transcription, l'ARNr (42). A ce titre, chez la levure, les facteurs Spt4 et Spt5, homologues de DSIF chez l'homme, couplent la transcription Pol 1 et la maturation du pré-ARNr (43).

### 1.1.3 Terminaison de la transcription par Pol 1

Chez les eucaryotes supérieurs, on sait depuis longtemps que la terminaison de la transcription par la Pol 1 se divise en deux étapes : d'abord la pause des complexes en cours d'élongation, puis la libération du pré-ARNr et de la Pol 1 de la matrice d'ADN par un facteur particulier (44). Ce facteur avait initialement été nommé facteur de libération de Pol 1 et du transcrit (PTRF) et se liait de manière spécifique aux transcrits qui contenaient les extrémités 3' du pré-ARNr. Chez la souris, dix éléments terminateurs de la transcription par Pol 1 sont situés en fin de la séquences codantes : les boîtes Sal, de T1 jusqu'à T10. Le facteur de terminaison spécifique de la transcription Pol 1, ou TTF-1, se lie aux boîtes Sal et permet la terminaison de la transcription (45). Chez l'homme, on retrouve également de multiples boîtes Sal, dont le nombre dépend du nombre de copies de rDNA présentes dans la cellule (46). La terminaison de la transcription est encore peu étudiée chez l'homme, mais chez la levure, un mécanisme proche du mécanisme torpille de la Pol 2 semble être en place : dans un premier temps, l'endonucléase Rnt1 clive le pré-rRNA naissant après synthèse d'une séquence spécifique. Dans un second temps, l'exonucléase 5' vers 3' Rat1 (Xrn2 chez le mammifère) dégrade le produit de clivage associé à la Pol 1, en coopération avec l'hélicase ARN Sen1 (47). C'est la polynucléotide kinase Grc3 qui phosphoryle en 5' le produit du clivage par Rnt1 pour permettre sa dégradation par Rat1 (48). Lorsque Rat1 rattrape la Pol 1, son complexe avec l'ADNr est instable et il y a dissociation, et *de facto* terminaison de la transcription. La sous-unité A12.2 (RPA12 chez l'homme) semble indispensable à la terminaison de la transcription, d'autant plus qu'elle est une homologue de Rpb9 chez la Pol 2 et de Rpc11 chez la Pol III, qui sont toutes deux impliquées dans la terminaison de la transcription (49).

Néanmoins, afin de produire suffisamment de transcrits, la Pol 1 doit pouvoir réinitier de nouveau la transcription dans un laps de temps très faible. Les sites de liaison de TTF-1 T0 et Tsp sont localisés respectivement en aval du promoteur du rDNA et en amont de la région spacer de l'unité d'ADNr. En se liant à ces sites, TTF1 permet la création d'une boucle d'ADN qui facilite grandement une transcription efficace (50). SL1 est notamment impliqué dans la formation de cette boucle, comme évoqué plus haut (30). De plus, si TIF-1A doit quitter le promoteur pour permettre la transition vers la phase d'élongation, ce n'est pas le cas du dit SL1 et d'UBF, qui restent liés au promoteur (et même tout le long de l'unité d'ADNr pour UBF) (27,51). L'interaction réversible TIF-1A-Pol1 semble être la clé d'une ré-initiation rapide de la transcription par l'ARN Pol 1. TIF-1A peut d'ailleurs être déphosphorylée sur les sérines 170 et 172, ciblées par CK2, par la phosphatase FCP1. Cette déphosphorylation est requise pour la reformation du complexe Pol 1-TIF-1A, et donc pour la ré-initiation (26). Chez la levure, ces deux sérines ne sont pas conservées et c'est la phosphorylation de la Pol 1 qui semble réguler la formation du complexe (52). Toutefois, FCP1 est tout de même impliquée dans la transcription Pol 1 chez la levure, mais plutôt dans le cadre de l'élongation (52). Néanmoins, le mécanisme de ré-initiation n'est pas complètement compris à ce jour, et de nombreuses autres protéines doivent être impliquées dans ce processus indispensable pour l'efficacité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 1. La figure 1 résume ce processus de transcription (adaptée de (53)).



**Figure 1 : Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 1.**

I. Assemblage du complexe de pré-initiation (PIC), avec SL1 dans la région du promoteur et UBF pour permettre une conformation favorable. II. Recrutement de l'ARN Polymérase 1 par TIF-1A. III. Echappement du promoteur par la libération de TIF-1A et initiation de la transcription. IV. Phase d'élongation de la transcription. De nombreux facteurs sont impliqués en plus d'UBF et de SL1. V. Terminaison de la transcription : TTF1 reconnaît les boîtes Sal et initie le processus de terminaison. VI. Le promoteur reste engagé, et TIF-1A peut facilement interagir de nouveau avec l'ARN Polymérase 1 pour réinitier rapidement la transcription.

## I.II La transcription par l'ARN Polymérase 2

L'ARN Polymérase 2 (RNAP2), également constituée de plusieurs sous-unités (Tableau 2) synthétise les ARN messagers (ARNm) à partir des séquences ADN codantes, mais également des petits ARN nucléaires (ARNsn) et des micro-ARN (miARN). Les ARNm seront traduits en protéines par les ribosomes. L'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 2 est de loin la plus étudiée. Il existe des similitudes, mais aussi des différences, avec le processus transcriptionnel de l'ARN Polymérase 1.

### *I.II.1 Initiation de la transcription*

L'ARN Polymérase 2 est associée à de nombreuses protéines, et son activité est finement régulée par des activateurs ou répresseurs transcriptionnels. La Pol 2 doit former le complexe de pré-initiation (PIC), en association avec des facteurs de transcription, afin que la transcription puisse être initiée. Le PIC peut contenir plus de 100 protéines, parmi lesquelles cinq sont indispensables, en plus de la Pol 2 : les facteurs de transcription généraux (GTFs), à savoir TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH (54). Outre ces GTFs, le Médiateur est également indispensable : composé de plus de vingt sous-unités, il est à la fois coactivateur, corépresseur et facteur de transcription général (55). La séquence d'assemblage du PIC a pu être définie en utilisant des systèmes *in vitro*. Dans un premier temps, TFIID, qui contient parmi ses sous-unités la protéine TATA box binding (TBP), est recruté au promoteur du gène. TBP est suffisant pour une activité transcriptionnelle basale sur des promoteurs contenant la boîte TATA, situé approximativement 30 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) (56). TFIIA modifie la confirmation de TFIID au niveau du complexe TBP/boîte TATA pour permettre l'interaction avec l'ADN (57,58). Par la suite, TFIIB va incliner l'ADN à 90° environ en s'y liant (59). TFIIB interagit également avec TBP et le core de l'ARN Pol 2 (60). TFIIF est recruté après tous les TF précédents, associé à la Pol 2. Il semble être crucial pour la stabilité de TFIIB dans le PIC (61). Enfin, TFIIH arrive en dernier, associé à TFIIIE. Tous deux participent à la transition du PIC vers un complexe ouvert. TFIIH est d'ailleurs le seul GTF avec une activité enzymatique : XPB et XPD, des protéines du core, sont des hélicases, et Cdk7, du CAK, est une kinase. XPB est en charge de la dénaturation du promoteur (62).

De son côté, le Médiateur stabilise le PIC et est nécessaire pour l'initiation de la transcription (63). Il est divisé en quatre modules : la tête et le milieu forment le core Médiateur (64) tandis que les modules queue et kinase ont des rôles de régulation (65). Le Médiateur est recruté au niveau des amplificateurs, via des facteurs de transcription. Il favorise le bouclage du gène, ce qui améliore les contacts amplificateurs-promoteurs (66). Suite au bouclage, le Médiateur interagit avec l'ARN Pol2 (67), avec TBP (68) et TFIIH (69). De plus, le Médiateur est également capable d'influencer l'état de la chromatine : aux alentours de régions promotrices inductibles ou constitutivement actives, le Médiateur est impliqué dans le recrutement du complexe Swi/Snf, qui participe à l'éviction des histones. Cependant, comme le Médiateur a besoin de la Polymérase 2 pour interagir avec les TBP aux alentours de plusieurs régions promotrices, le PIC dans son intégralité est nécessaire à l'éviction des histones (70). De plus, le Médiateur est directement influencé par les modifications de queues d'histone : il est associé de manière stable aux queues des histones H3 et H4, et l'acétylation de la lysine 16 des H4, qui contribue à l'interruption de la transcription, inhibe l'interaction du Médiateur (71).

Sous-unité	Gène codant pour la sous-unité	Poids (kDa)
RPB1	POLR2A	217
RPB2	POLR2B	134
RPB3	POLR2C	31
RPB4	POLR2D	16
RPB5	POLR2E	25
RPB6	POLR2F	14
RPB7	POLR2G	19
RPB8	POLR2H	17
RPB9	POLR2I	15
RPB10	POLR2L	8
RPB11 (RPB11-a, RPB11-b et RPB11-c)	POLR2J, POLR2J2 et POLR2J3	13, 13 et 13
RPB12	POLR2K	7

**Tableau 2 : Les sous-unités de l'ARN Polymérase 2.**

### 1.II.2 De l'initiation à l'élongation

Afin que la transcription puisse débuter, le PIC doit devenir un complexe ouvert. Au niveau du site d'initiation de la transcription, noté comme position +1, l'ADN est double brin. Il doit être ouvert pour former une bulle de transcription (position entre - 10 et + 2 autour du site d'initiation de la transcription). La sous-unité XPB du complexe TFIIH va agir comme une clé anglaise pour modifier la conformation de l'ADN. Elle va également « ouvrir » l'ADN en dénaturant les deux brins (60). La transcription débute alors de façon abortive : des ARN longs de 2-3 nucléotides sont synthétisés de manière répétée (72). Le CTD de RPB1, la plus grosse sous-unité de l'ARN Pol 2, contient 52 heptarépétitions avec une séquence consensus, YSPTSPS. Cdk7 phosphoryle la sérine en position 5 du CTD de RPB1 (73). Ceci a pour effet de déstabiliser l'interaction entre la Pol 2 et la multitude de facteurs liés au promoteur, favorisant ainsi l'échappement du promoteur de la Pol 2 (74). De manière intéressante, il a été démontré que chez la levure, Kin28, l'équivalent de Cdk7, stimule l'échappement du promoteur en dissociant le Médiateur de la Pol 2, mais ne stimule pas l'élongation *per se* (75). Une fois libéré du promoteur, la Pol 2 doit faire face à un autre obstacle dans sa progression : la barrière nucléosomique. Chd1, un remodelleur de chromatine, est recruté au promoteur et joue un rôle dans le turn-over des nucléosomes afin de permettre une avancée fluide de la Pol 2 (76). Après avoir synthétisé entre 25 et 50 nucléotides, la Pol 2 cesse son activité transcriptionnelle. Durant cette pause, l'ARN néosynthétisé est soumis à plusieurs contrôles qualité.

Deux facteurs sont impliqués dans cette pause : le Facteur d'Elongation Négative (NELF) et le facteur induisant la sensibilité à DRB (DSIF) (77). DSIF est conservé chez la levure, tandis que NELF ne l'est pas. Cependant, il a été récemment démontré *in vitro* que le passage en pause pourrait être inhérent au PIC, et en particulier à TFIID, et que NELF et DSIF pourraient simplement servir à ajouter un niveau de régulation à ce phénomène (78). DSIF interagit avec l'ARN néosynthétisé, et sa présence permet l'interaction entre NELF et l'ARN Pol 2 (79). NELF empêche la réactivation du site catalytique de la Pol 2 (80). Cette pause sert plusieurs objectifs : tout d'abord, une Pol 2 en pause est en compétition avec les nucléosomes pour occuper des promoteurs hautement régulés, et ceci empêche la formation de structures défavorables de la chromatine (81). De plus, une Pol 2 en pause empêche l'initiation d'une nouvelle transcription au niveau du promoteur (82). Enfin, un nombre élevé d'ARN Polymérase 2 en pause coïncide souvent avec un enrichissement en facteurs de régulation de voies de développement, de prolifération mais aussi de réponses au stress et/ou dommages (83). Il a même été suggéré que la pause de la Pol 2 joue un rôle dans la différenciation cellulaire des cellules souches embryonnaires (84).

C'est le facteur d'élongation positive b (P-TEFb) qui est en charge de la sortie de la pause. Il est recruté par le Médiateur (85) et BRD4, une protéine qui se lie aux lysines acétylées sur les queues des histones core (86), entre autres. P-TEFb contient notamment la sous-unité CDK9, une kinase qui est activée par Cdk7 (87). Une fois activée, elle phosphoryle plusieurs cibles, parmi lesquelles la sous-unité Spt5 de DSIF (88). Une fois cette dernière phosphorylée, NELF est libéré de la Pol 2. NELF est d'ailleurs directement phosphorylée par CDK9. CDK9 agit également sur le CTD de RPB1 : elle phosphoryle la Sérine 5 (89), et la Sérine 2 (87) qui peut également être phosphorylée par CDK12 (90). Le CTD phosphorylé en position 2 et 5 est associé à une Pol 2 en début de phase d'élongation (91).

### I.II.3 De l'élongation à la terminaison

A mesure que la Pol 2 avance sur l'ADN, le niveau de phosphorylation de la Sérine 5 diminue, tandis que le niveau de Sérine 2 phosphorylée augmente. DSIF est toujours présent, mais dans une conformation modifiée après avoir été phosphorylé. Dans cette configuration, DSIF renforce la conformation « anneau de serrage » (closed clamp) de RNAP2 afin de faciliter le passage de l'ADN matrice (92). Pour avancer de façon fluide à travers la chromatine, la Polymérase 2 s'associe avec les FACTs, qui facilitent la transcription à travers la chromatine. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histone, deux dimères H2A-H2B et un tétramère H3-H4, et FACT déloge les dimères H2A-H2B afin d'aérer le nucléosome (93). Le complexe PAF1C, qui s'associe à la Pol 2 au moment de la pause, voyage avec elle au cours de l'élongation et sert de plateforme de recrutement pour plusieurs remodeleurs d'histones, comme par exemple CHD1 (94), ou des modificateurs d'histones, comme COMPASS, une méthyltransférase H3K4, ou DOT1L, une méthyltransférase H3K79 (95).

Le mode de terminaison de la transcription Pol 2 le plus étudié repose sur un signal de polyadénylation (PAS), qui permet le clivage et la polyadénylation du pré ARNm (96). Le PAS comporte un motif AAUAAA, avec des régions riches en U en amont et des régions riches en U/GU en aval. Un complexe de clivage et polyadénylation (CPA) reconnaît ces séquences et procède à une coupure entre le AAUAAA et les éléments en aval. Parmi les composants du CPA, on retrouve le complexe CPSF (Cleavage and polyadenylation specificity factor). Dans ce complexe, la sous-unités CPSF30 s'associe directement à la séquence AAUAAA, en compagnie de la protéine WDR33 (97). La sous-unité CPSF73 procède au clivage (98). Il est important de noter qu'une modification du signal de polyadénylation abolit totalement la terminaison de la transcription (99).

Initialement, deux modèles de terminaison ont été conceptualisés : le modèle allosteric/antiterminator et le modèle torpedo. Dans le premier modèle, la transcription du PAS conduit à un changement de conformation de la Pol 2 ou à la dissociation de facteurs de transcription, les deux cas amenant à la terminaison de la transcription. En parallèle, des facteurs anti terminaisons tels que SCAF4 et SCAF8 empêchent l'activation de sites précoces de polyadénylation. En leur absence, des terminaisons précoces, via des sites de polyadénylation situés dans le corps du gène, peuvent se produire (100). Ces terminaisons précoces peuvent également se produire en cas de déplétion de la petite ribonucléoprotéine U1 (101), de Cdk12 (102) ou de la poly(A)-binding protein nuclear 1 (PAPBN1) (103). In vitro, les changements de conformation de la Pol 2 nécessaires à la transcription peuvent même se produire sans clivage du transcrit (104). Ce clivage n'est d'ailleurs pas visible en cas d'observation au microscope électronique de la transcription (105). Toutefois, une dégradation rapide du produit de clivage expliquerait ce cas de figure, et il est peu probable que la terminaison ait lieu avant le clivage du transcrit, puisqu'une mutation du PAS conduit au blocage des transcrits sur le locus du gène (106).

Le modèle Torpedo implique la dégradation du produit de transcription du PAS par une exonucléase 5' vers 3'. La terminaison de la transcription est activée lorsque l'exonucléase atteint la Polymérase 2. Le fait que la déplétion de l'exonucléase nucléaire 5' vers 3' XRN2 chez l'homme implique des problèmes de terminaison de la transcription donnait corps à ce modèle (107). Initialement, le clivage du produit de transcription du PAS semblait nécessaire uniquement au modèle Torpedo. Néanmoins, il a été montré qu'une mutation inactivant CPSF73 du complexe de clivage et polyadénylation bloquait la terminaison de la transcription, amenant la nécessité de développer un nouveau modèle de terminaison (108).

La réalité semble être plus proche d'une unification des deux modèles : dans un premier temps, un changement de conformation permet le ralentissement de la Pol 2 une fois que le PAS a été transcrit. La déphosphorylation du facteur d'élongation Spt5 par PP1 semble être la cause de ce changement, comme observé chez la levure (109). L'équivalent humain de PP1 et son facteur de ciblage nucléaire, PNUTS, sont présents dans le CPA, indiquant que le modèle unifié semble être la règle chez l'homme également (110). Chez la levure, PP1 déphosphoryle également les tyrosine 1 dans le CTD de la levure, participant au recrutement du CPA (111), et la mutation de ces tyrosines chez l'homme provoque des problèmes de terminaison de la transcription (112). Enfin, PP1 phosphoryle notamment p54/nrb, connu pour participer au recrutement de la « torpille », XRN2 (113). Il est intéressant de noter que les R-loops formés entre l'ADN et le néo-ARNM participent également à faciliter la terminaison de la transcription : d'abord par leur simple présence, en créant du stress torsionnel qui ralentit la progression de la Pol 2 (114), mais également lors de leur résolution, notamment par l'hélicase SETX qui facilite la terminaison XRN2-dépendante de la transcription (115). Ce changement conformationnel réduit drastiquement la vitesse de la RNAP2, qui passe d'environ 2 kb/minute à 0.1 kb/minute (116).

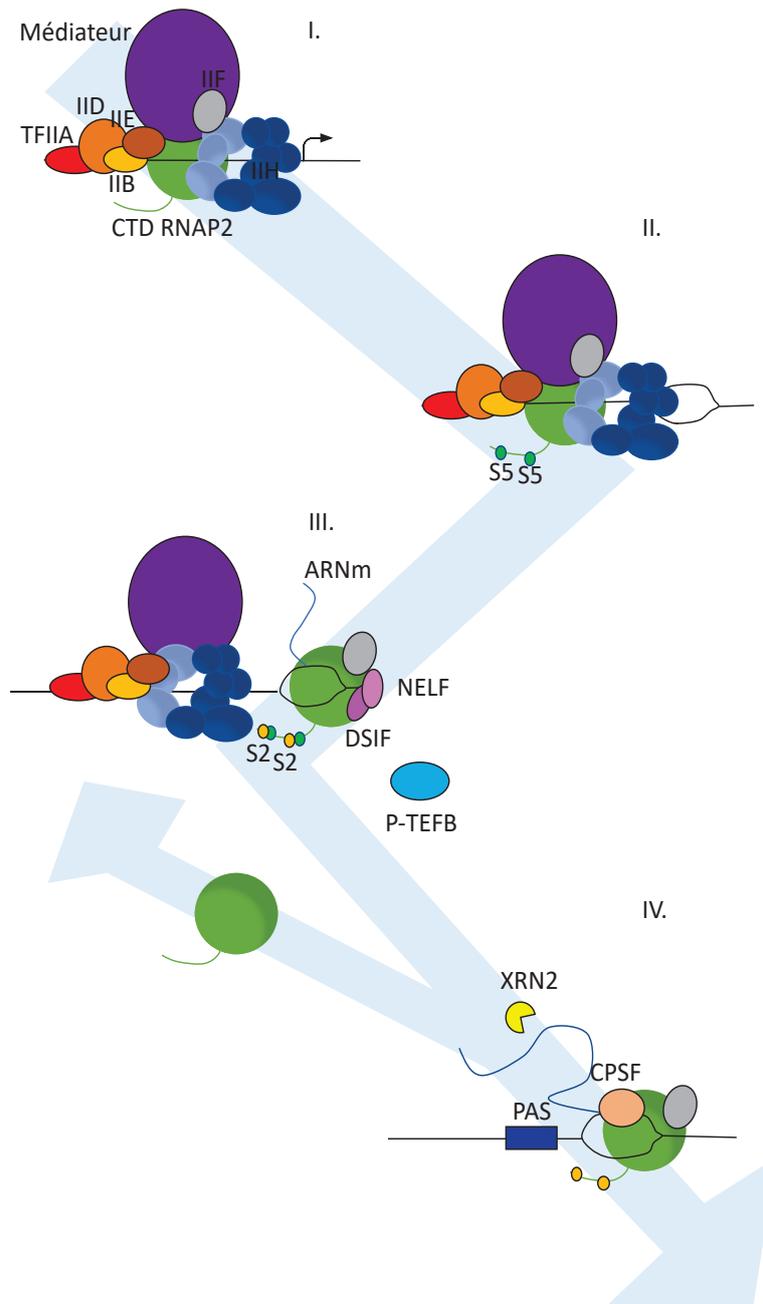
Ce ralentissement de la Polymérase 2 la rend incapable de fuir XRN2. Bien que sa vitesse de dégradation soit inconnue, sa contrepartie cytoplasmique XRN1 peut dégrader jusqu'à 2.3 kb/minute (117). Ce modèle explique également pourquoi en l'absence de CPSF73, des centaines de kilobases étaient dégradées : le changement conformationnel médié par PP1 n'avait pas lieu, et XRN2 devait poursuivre la Pol 2 en cours de transcription, non ralentie, sur une longue distance. Dans le modèle unifié, PP1 et PNUTS déphosphorylent SPT5 suite au clivage du PAS. Ceci ralentit la Pol 2, permettant à XRN2 de la rattraper en dégradant seulement quelques nucléotides et de terminer la transcription. Toutefois, étant donnée l'importance de l'arrêt de la transcription, d'autres mécanismes de terminaison doivent être mis en place par la cellule. Comme des cellules sans XRN2 sont capables de terminer la transcription, même de façon plus lente (116), ces mécanismes doivent être XRN2-indépendants.

Parmi ces solutions alternatives, on retrouve la terminaison au niveau des histones réplication-dépendants. Les extrémités 3' sont clivées par CPSF73, qui est recruté par le petit ARN nucléaire U7 comme membre du complexe de clivage des histones (118). XRN ne semble pas impliqué, puisque l'expression d'un XRN2 dégradable par induction à l'auxine n'a pas d'effet sur ce mécanisme de terminaison. Toutefois, l'expression d'un XRN2 inactif affecte plus sévèrement ce mécanisme, ce qui semble indiquer une compétition spatiale entre XRN2 et d'autres exonucléases (119). Bien que CPSF73 n'ait pas directement d'activité exonucléase, certains indices indiquent qu'elle pourrait être l'éventuelle exonucléase dans ce mode de terminaison : tout d'abord, elle est similaire à la protéine bactérienne RNaseJ, qui est à la fois une endonucléase et une exonucléase (120). De plus, la RNA Polymerase archéenne se termine par un homologue de CPSF73, appelé FttA, qui est également doté d'une activité endonucléase et exonucléase (121). Toutefois, il n'est pas certain qu'une dégradation du produit de clivage soit absolument nécessaire pour la terminaison, et il n'est pas à exclure qu'un changement allostérique soit suffisant.

Les petits ARN nucléaires (ARNsn) sont traités en 3' par le complexe multi sous-unités Integrator, qui contient un paralogue de CPSF73 appelé INTS11 (122). Integrator se lie à la Pol 2 et possède un élément ARN 3' box pour prendre en charge les ARNsn. Une INTS11 catalytiquement active est nécessaire pour la terminaison de la transcription des snRNA (123,124). Une nouvelle fois, XRN2 n'est que peu voire pas impliquée dans cette terminaison (108,119). Ce modèle de terminaison s'approcherait du modèle allostérique, et les produits

libérés seraient dégradés par l'exosome, comme peut l'indiquer le fait que certains de ces produits soient liés au composant catalytique de l'exosome DIS3 (125). Parmi les facteurs notables impliqués dans ce mode de terminaison, on relève la présence de PCF11 du complexe de clivage et polyadénylation, qui est en mesure de terminer l'élongation par la Pol 2 sans activité exonucléase 5' vers 3' (126), rapprochant encore davantage ce mode de terminaison du modèle allostérique.

La plupart des promoteurs humains sont surchargés de Polymérase 2 à cause du mécanisme de pause qui suit l'initiation de la transcription. Néanmoins, des études récentes ont montré que la plupart de ces polymérases ne restent pas immobiles mais subissent un turn-over rapide (127,128). De manière intéressante, la déplétion du complexe Integrator inhibe ce turn-over sur de nombreux gènes (129). L'activité nucléase d'INTS11 est nécessaire pour la terminaison à proximité du promoteur et des sites de clivages sont trouvés près de l'extrémité 5' des transcrits. De plus, XRN2 n'est pas impliqué dans ce mode de terminaison, ce qui le rapproche de la transcription des snRNA (129). En outre, le complexe Integrator a également été impliqué dans la terminaison de la transcription de certains transcrits de l'amont du promoteur (PROMPTs) et de transcrits de régions amplificatrices, qui ont en commun d'être de petits transcrits sensibles à la dégradation par l'exosome (130,131). En outre, certaines terminaisons à proximité du promoteur pourraient utiliser des mécanismes similaires au PAS, puisqu'un signal de polyadénylation est observé sur ces transcrits, et des facteurs du CPA se lient directement à certains d'entre eux (132–134). Cependant, ce mécanisme est encore peu étudié, de par la vulnérabilité de l'ARN Polymérase 2 située dans ces régions proches du promoteur. L'étude de ce mécanisme sera une question majeure des années à venir pour mieux comprendre la terminaison de la transcription par la Pol 2. La figure 2 résume les grandes étapes de l'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 2.



**Figure 2 :** Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 2.

I. Assemblage du complexe de pré-initiation (PIC), avec les facteurs de transcription généraux (TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF, IIH) ainsi que le complexe Médiateur. II. L'activité hélicase de TFIIH permet l'ouverture de la double hélice, et son activité kinase gère la phosphorylation des sérines du CTD de l'ARN Polymérase 2. III. L'ARN Polymérase 2 passe dans une étape de pause à proximité du promoteur, initiée par l'association de DSIF et NELF. Une fois les vérifications inhérentes à ce processus de pause effectuées, P-TEFb phosphoryle ces deux facteurs pour les inactiver, ainsi que le CTD pour promouvoir l'élongation. IV. Une fois passé le signal de polyadénylation (PAS), le complexe CPSF clive les transcrits post-PAS, et XRN2 les dégrade en rattrapant une ARN Polymérase 2 ralentie. Cette dernière pourra réinitier la transcription sur des promoteurs déjà occupés par les TF et le Médiateur.

### I.III La transcription par l'ARN Polymérase 3

Contrairement à tous les autres ARNr, le précurseur du 5S est transcrit par l'ARN Polymérase 3 (RNAPol3), qui transcrit également tous les ARN de transfert et divers éléments essentiels comme le petit ARN nucléaire U6, le petit ARN nucléolaire snR52, et les composants ARN de la particule de reconnaissance du signal (SRP1) et de la RNase P (RPR1) (135). Les gènes RNA5S sont localisés sur le chromosome 1 et répétés en tandem chez l'homme. De plus, ils sont localisés à proximité du nucléole (136). La Polymérase 3 est une enzyme avec 17 sous-unités, 10 spécifiques (Tableau 3), 5 communes avec l'ARNPol2 (RPB5,6,7,10 et 12), et 2 communes avec l'ARNPol1 (RPAC1 et 2). L'ARNPol3 fonctionne avec 3 facteurs de transcription qui lui sont spécifiques : TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC (137). TFIIIA sert uniquement à la transcription des gènes codant pour l'ARNr 5S. TFIIIB est constitué de trois sous-unités, Brf1, Bdp1 et TBP, la TATA-binding protein. Enfin, TFIIIC est un complexe avec six sous-unités, qui reconnaît toutes les régions promotrices des unités de transcription Pol 3. Les régions promotrices des gènes codants pour les ARN de transfert (ARNt) transcrits par la Pol 3 comportent des séquences conservées, appelées boîte A et boîte B, qui donnent respectivement la boucle D et la boucle T dans les ARNt matures. Au niveau du promoteur de *RDN5*, le gène codant pour l'ARNr 5S, on retrouve la boîte A et une boîte gène-spécifique, appelée boîte C. Cette boîte C est reconnue par TFIIIA, dont c'est d'ailleurs la seule fonction essentielle (138). Cette association permet ensuite la fixation de TFIIIC. On peut néanmoins retrouver quelques spécificités de l'organisation dans d'autres gènes transcrits par la Pol 3 : les régions promotrices situées en 5' de l'ARN de la RNase P sont éliminées au cours de la maturation de cet ARN, tandis que le petit ARN nucléaire U6 a une boîte A interne, mais la boîte B a une boîte en aval du signal de terminaison de la transcription. Il possède également une boîte TATA reconnue par TBP (139).

L'initiation de la transcription par la Pol 3 a été largement étudiée *in vitro*, et les analyses à l'échelle du génome réalisées ces dernières années vont dans le sens des observations réalisées *in vitro*. Dans un premier temps, TFIIIC reconnaît et se lie aux éléments promoteurs, dont les boîtes A et B (140). Ceci amène au recrutement de TFIIIB en amont du site d'initiation de la transcription (141). Si les événements qui suivent sont moins caractérisés, on peut tout de même observer une forte accumulation de la Pol 3 au niveau des boîtes A et B sur tous les gènes codant pour des ARNt, ce qui pourrait indiquer un délai dans la transcription ou dans la séparation de la Pol 3 et du gène (142,143). Au contraire, on retrouve moins de TFIIIC lié au gène, ce qui pourrait indiquer son déplacement au cours de la transcription (144). Cependant, des études plus anciennes avaient identifié TFIIIC comme solidement liés à l'ADN au cours de la transcription (145). Une explication possible serait le détachement partiel de TFIIIC du gène : initialement, TFIIIC est détaché de la boîte A mais pas de la B, puis se raccroche à la boîte A avant de se détacher de la B (146).

Tout comme les deux autres polymérases, la Pol 3 a besoin d'un signal de terminaison de la transcription : le plus étudié est composé de plusieurs A de suite. La longueur minimale est de 4A chez l'homme, 5 ou 6 chez la levure (147), mais le signal semble plus efficace avec 7 ou 8 A *in vivo* (143). La faible liaison base-base entre les A du brin matrice et les U du transcrit naissant est la principale source de la déstabilisation de la liaison. De plus, la série de T du brin non matrice favorise également la pause de la polymérase, la formation du complexe de pré terminaison et la libération du transcrit (148). Néanmoins, chez l'homme et chez la levure, on peut noter un certain nombre de transcrit qui s'étendent après la série de U synonyme de terminaison (149,150). Ces régions non canoniques sont la cible du complexe exosome nucléase, afin d'éviter leur accumulation (151). De plus, Nab2, une protéine capable de se lier

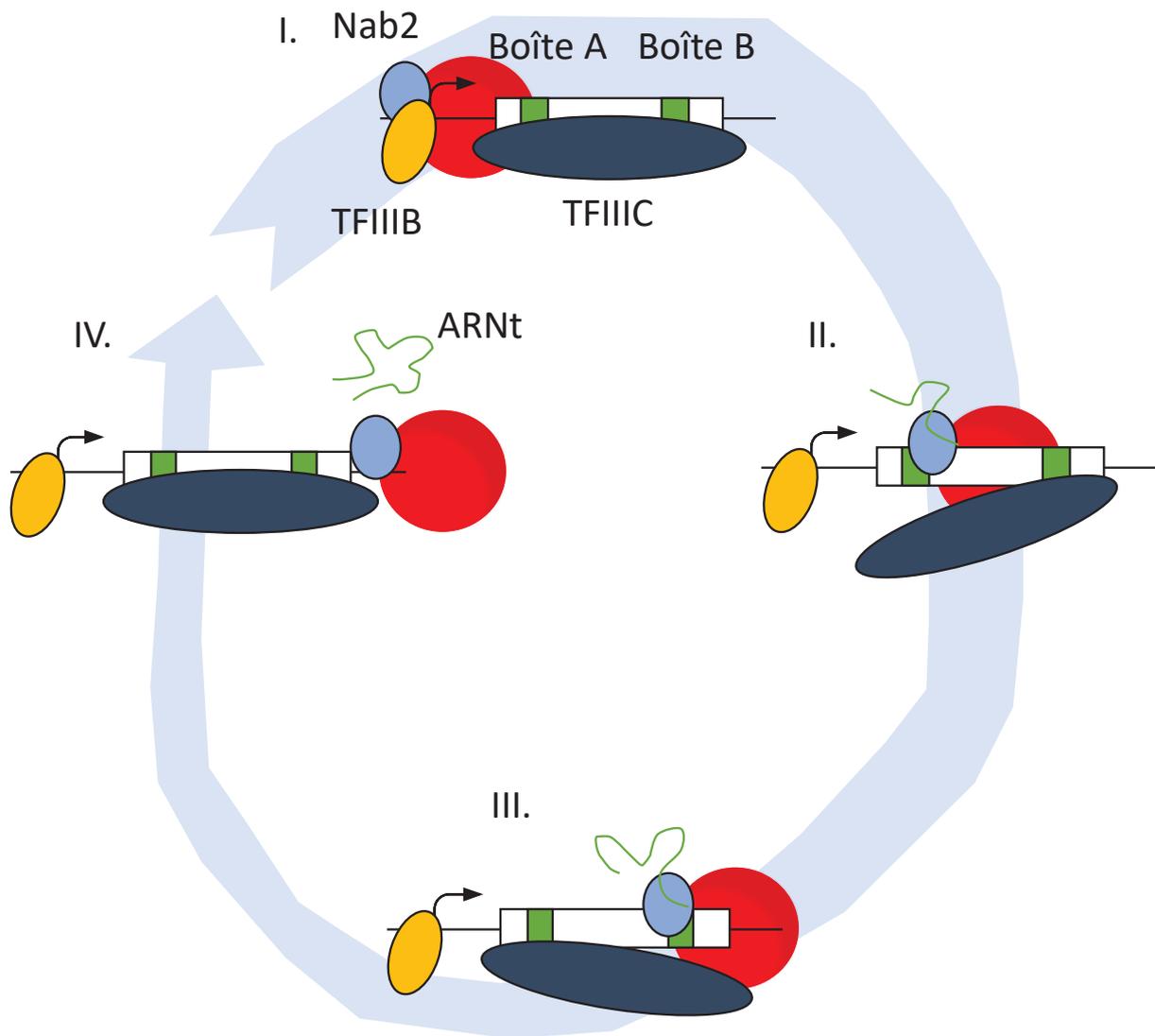
à l'ADN, est impliquée dans la transcription par la Pol 3 (152), ainsi que dans le contrôle qualité des pré-ARNt (153) et la dégradation des éléments post-signal de terminaison (143). Nab2 se lie directement en 5' des tRNA et interagit avec TFIIIB et la Pol 3 (153) et pourrait coupler l'initiation de la transcription avec les activités de surveillance. Enfin, la ré-initiation de la transcription après la terminaison est capitale pour une transcription efficace par la Pol 3 (154). Les gènes avec le plus de transcrit post-signal de terminaison sont ceux qui ont les taux de transcription les plus faibles (143), et ceci pourrait être dû à l'éloignement spatial entre le site d'initiation, les facteurs de transcription et la Pol 3 (146).

L'ARNr 5S, en plus de ne pas être transcrit par l'ARN Polymérase 1, est unique car il forme une particule pré-ribosomale avec la riboprotéine L5 (155). De plus, il interagit avec de nombreuses autres protéines avant d'intégrer la forme finale du ribosome, et il n'est pas transcrit au sein du nucléole. Cependant, la particule pré-ribosomale est amenée au sein du nucléole. Initialement, l'association avec les autres composants du ribosome semblait tardive (156). Il apparaît en réalité qu'elle intervient très tôt : en effet, chez la levure, les facteurs d'assemblage Rpf2 et Rrs1 l'intègrent au sein du noyau où elle sera associée avec le précurseur 35S dans le pré-ribosome 90S (157). Le métabolisme de l'ARNr 5S commence par une association transitoire avec la protéine La. Seuls 1 à 2% des ARNr 5S sont retrouvés liés à La (158). La s'associe également avec d'autres transcrits de la Pol 3, dont elle reconnaît les 3' uridylylates. Elle est une chaperonne de la maturation et de la stabilité de ces divers ARN (159,160). La est essentielle chez les mammifères et les drosophiles, mais pas chez la levure, peut-être à cause de l'existence de voies alternatives spécifiques (161,162). La possède dans sa séquence un signal de localisation nucléaire (NLS), un signal de rétention nucléaire (NRE) et un signal de localisation nucléaire.

Suite à l'association avec La, l'ARNr 5S s'associe donc avec la protéine ribosomale L5. Ceci permet de le stabiliser (163). Le niveau de L5 régule le niveau de 5S (164). Si d'autres protéines peuvent se lier à l'ARNr 5S pour l'amener dans le cytoplasme, L5 est la seule à pouvoir l'amener dans le noyau. Les NLS de L5 sont situées dans deux régions de la séquence, entre les aa 21-37 et 255-265, tandis que la séquence d'export nucléaire est située entre les aa 101 et 111 (165). Une fois transcrit, l'ARNr 5S voit ses extrémités 3' être dégradées par les exonucléases Rex1p, Rex2p et Rex3p chez la levure (166), trois membres de la famille RNase D. Enfin, la protéine Ro, capable de se lier à différentes formes du transcrit 5S mesurant entre 69 et 112 nucléotides (167) est chargée de la surveillance du bon fonctionnement transcriptionnel et de l'élimination des transcrits en excès. Les ARNr 5S sont sensibles à la polyadénylation et donc à la dégradation par l'exosome (168). La figure 3 résume l'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 3 (adaptée de (146)).

Sous-unité	Gène codant pour la sous-unité	Poids (kDa)
RPC1	POLR3A	155
RPC2	POLR3B	128
RPC3	POLR3C	61
RPC4	POLR3D	44
RPC5	POLR3E	80
RPC6	POLR3F	36
RPC7/RPC7L	POLR3G/POLR3GL	26/25
RPC8	POLR3H	23
RPC9	CRCP	17
RPC10	POLR3K	12

**Tableau 3 :** *Les sous-unités de l'ARN Polymérase 3.*



**Figure 3** : Schéma général de la transcription par l'ARN Polymérase 3.

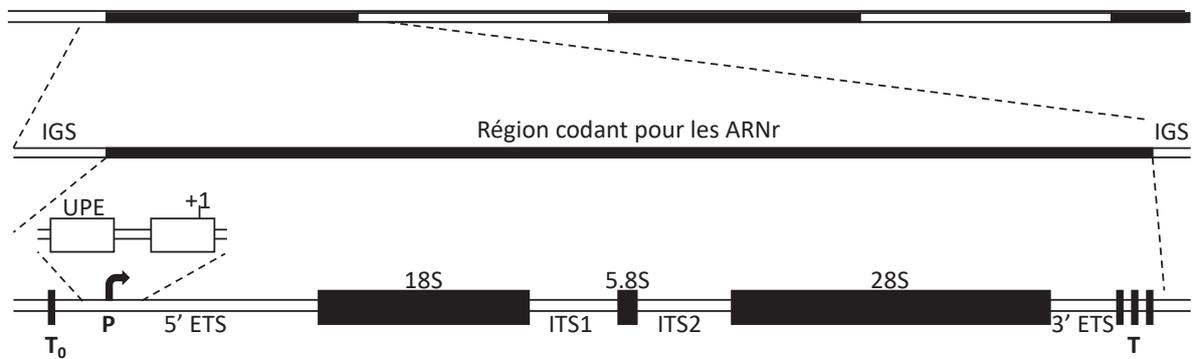
I. TFIIC reconnaît les boîtes A et B et recrute TFIIB. Nab2 facilite cette interaction. La RNA Polymérase 3 est recrutée après les deux facteurs de transcription. II. L'ARN Polymérase 3 entame l'élongation, durant laquelle elle reste associée à Nab2. III. Au cours de l'élongation, TFIIC assure toujours l'association avec l'ADN de transfert, notamment en ne se liant pas simultanément à la boîte A et B en fonction des contraintes spatiales. IV. L'ARN Polymérase 3 termine la transcription lorsqu'elle transcrit un oligo poly-U et peut ensuite réinitier la transcription.

## II. La biogénèse des ribosomes

Les ribosomes sont des machineries cellulaires indispensables au bien-être du vivant. Ils sont en charge de la traduction, c'est à dire la synthèse des protéines à partir de l'ARNm transcrit par la Pol 2. Chez les eucaryotes, un ribosome se compose de deux sous-unités : la petite sous-unité, nommée 40S, et la grande sous-unité, nommée 60S. La petite sous-unité est constituée de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S ainsi que de 33 protéines ribosomiques (Rps), tandis que la grande sous-unité est constituée des ARNr 28S, 5.8S et 5S et de 47 protéines ribosomiques (Rpl) (169). A l'exception de l'ARNr 5S, transcrit par l'ARN Polymérase 3, tous les ARNr sont synthétisés par la Pol 1. Les ADNr sont d'abord transcrits en un seul produit, le pré-ARNr 47S, qui subira ensuite plusieurs clivages et dégradations par des exonucléases, ainsi que des modifications post-transcriptionnelles variées, au cours d'un processus de maturation. A l'issue de cette maturation seront formés les trois ARNr évoqués ci-dessus : le 28S, le 5.8S et le 18S. La synthèse du pré-ARNr 47S ainsi qu'une partie du processus de maturation ont lieu dans une organelle unique : le nucléole.

### II.1. Le nucléole et l'unité d'ADNr

Le nucléole est une organelle du noyau des cellules eucaryotes. S'il est intimement lié aux ADNr, ses fonctions vont néanmoins bien au-delà de la simple synthèse des ribosomes : il a de nombreux rôles dans l'homéostasie épigénétique de la cellule (170). Le nucléole est une organelle sans membrane, situé à l'intérieur du noyau des cellules, seul ou accompagné d'autres nucléoles. Les nucléoles sont formés à partir des régions organisatrices du nucléole (NORs), qui sont composées de plusieurs clusters d'unités d'ADNr. Chez l'homme, on retrouve les NORs sur le bras court de cinq chromosomes acrocentriques (le 13, le 14, le 15, le 21 et le 22). Une unité d'ADNr est divisée en une séquence codant pour le pré-ARNr 47S qui mesure environ 13 kb, et une séquence intergénique appelée Intergenic spacer (IGS), longue d'environ 30 kb. La séquence codante comporte un External Transcribed spacer (ETS), la séquence codante du futur ARNr 18S, l'Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), la séquence codante du futur ARNr 5.8S, un second ITS (ITS2), la séquence codante du futur ARNr 28S, et un second ETS (Figure 4). L'IGS contient des éléments régulateurs, des barrières aux fourches de réplication et peut-être même des séquences codantes transcrites par la Pol 2 (171). La séquence de l'ARNr 5S se situe exclusivement sur le chromosome 1 chez l'homme et elle est transcrite à la périphérie du nucléole ou dans le compartiment euchromatique du noyau (172).



**Figure 4 : Schéma de l'organisation des gènes ribosomiques.**

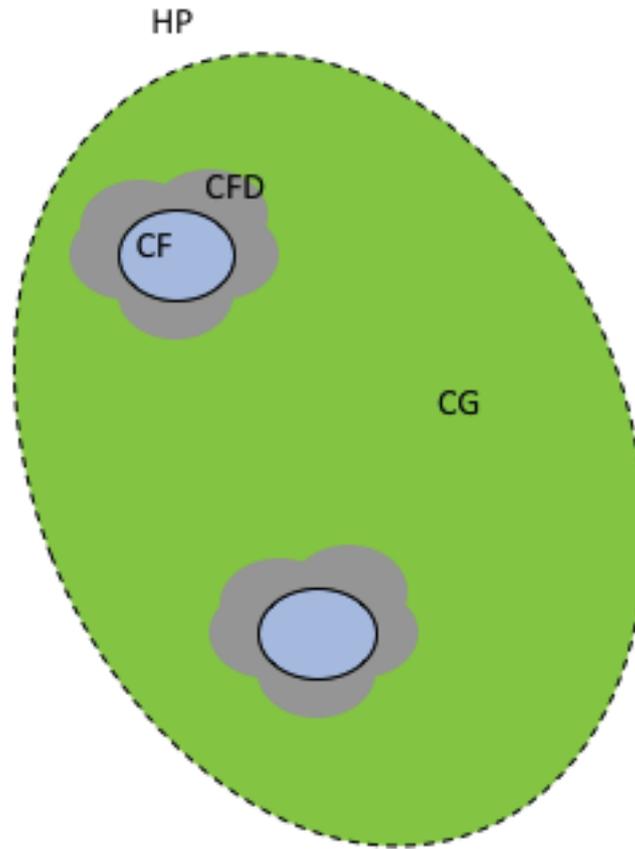
Les gènes ribosomiques sont présents en plusieurs centaines de répétitions. Une répétition est constituée par une région non transcrite, l'Intergenic Spacer (IGS), d'environ 30 kb, et une région codante pour les ARNr, d'environ 13 kb. Cette dernière est divisée en plusieurs éléments : une partie dite 5' External Transcribed Spacer (ETS), le futur ARNr 18S, une partie dite Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), le futur ARNr 5.8S, une partie dite Internal Transcribed Spacer 2, le futur ARNr 28S et une partie dite 3' External Transcribed Spacer. L'unité transcriptionnelle est flanquée de séquences de terminaison de la transcription ( $T_0$  et  $T$ ). La région promotrice (P) se compose d'une séquence Core (-45 à +18 relativement au site d'initiation de la transcription, le +1) et d'une séquence en amont, l'Upstream Promoter Element (UPE).

Le nucléole peut être divisé en trois types de régions : le composant granulaire (CG), qui contient un ou plusieurs composants fibrillaires denses (CFD), au centre de chacun duquel on trouve un centre fibrillaire (CF) (Figure 5, adaptée de (173)). Le nucléole est entouré d'une couche d'hétérochromatine, nommée chromatine périnucléolaire, depuis laquelle des brins de chromatine pénètre dans le GC, formant la chromatine intranucléolaire (170). La majorité de l'ADNr se situe dans le CF ou dans le CFD (174), où il peut être actif ou inactif (175), tandis qu'il est a priori forcément inactif en dehors du nucléole. Plusieurs hypothèses justifient l'une ou l'autre location : selon certains, les ARNr naissants génèreraient les CFD (176), tandis que d'autres les situent dans les CF car Pol 1 y a été localisée (177). Enfin, une dernière hypothèse place la transcription Pol 1 dans les CFDs, où l'on retrouve la fibrillarine (FBL), qui permettrait de maintenir la chromatine dans un état ouvert pour favoriser la haute activité transcriptionnelle de la Pol 1 (178).

Le nucléole est une structure extrêmement dynamique, dont la composition change au fil des développements ou entre les tissus, ainsi qu'en fonction des conditions cellulaires. Plus de 500 protéines ont été localisées dans le nucléole suite à des analyses de protéomique (179). UBF est le chef d'orchestre qui regroupe toutes ces protéines, et il a été montré qu'un UBF localisé de façon ectopique provoque la formation de pseudo-NORs (14). Ce facteur de transcription indispensable de la Pol 1 est également le marqueur des CF. La fibrillarine est le marqueur des CFD, et la nucléophosmine est le marqueur du CG. Ces deux protéines sont retrouvées parmi les centaines de protéines du nucléole et occupent des fonctions cruciales pour la maturation des ARNr (3,180). Les NORs inactifs se trouvent hors du nucléole (175)

Au cours du cycle cellulaire, le nucléole est désassemblé à la métaphase et réassemblé par la suite, au début de la télophase, quand les facteurs de traitement des ARNr sont recrutés. Cependant, ce recrutement est indépendant de la transcription par la Pol 1 (181). En fin de mitose, les protéines nucléolaires s'accumulent en corps prénucléolaires (PNB), avant de s'associer aux NORs pour former le nucléole *per se* (182). Les dommages à l'ADN contribuent également à modifier la structure nucléolaire : en cas de cassures double brins (DSBs), que ce soit sur les ADNr (183) ou hors du nucléole (184), la transcription Pol 1 est interrompue et les CF et CFD migrent à la périphérie du CG, avec les protéines de la réparation et de réponse aux dommages, formant les coiffes nucléolaires (Nucleolar caps) (185,186). Les cassures dans la région codant pour le 45S peuvent également être réparées par un processus ATM-dépendant, avec relocalisation à la périphérie, avec la nucléoline et la nucléophosmine (187). Enfin, après lésions UV, la Pol 1 sera déplacée en périphérie du nucléole où elle restera plusieurs heures pour y être réparée par le TC-NER, avec une non-reprise de la transcription tant que toutes les lésions ne sont pas réparées (188).

L'ARN Pol 1 transcrit les copies actives d'ADNr en un premier produit, le pré-ARNr 47S. A partir de ce produit commence un long processus de maturation qui aboutira à la formation des ribosomes matures. Près de 200 facteurs d'assemblage des ribosomes (AFs) et environ 80 petits ARN nucléolaires (snRNAs) sont impliqués dans ce travail titanesque, qui est sans doute le processus qui requière le plus d'énergie de la cellule. La découverte de la formation d'un ARN précurseur de grande taille, qui subit des modifications co-transcriptionnelles pour aboutir à la formation de 3 ARNr différents, remonte à près de 50 ans (189). Une centrifugation avec gradient de sucrose a permis l'établissement du coefficient de sédimentation des différentes formes maturées de cet ARN de grande taille, à l'époque appelées particules pré-ribosomales 90S, 66S et 43S (156). A la même époque, la structure « en sapin de Noël » des polymérase 1 synthétisant plusieurs ARNr le long d'une seule unité d'ADNr a également été repérée par microscopie électronique (190). L'étude de la levure a permis de définir que la maturation du 18S se termine dans le cytoplasme (191).



**Figure 5 :** *Schéma de la structure du nucléole.*

Il est entouré de l'hétérochromatine périnucléolaire (HP), et divisé en trois structures : les centres fibrillaires (CF) qui sont entourés du composant fibrillaire dense (CFD) et reposent dans le centre granulaire (CG).

Son émergence en tant que modèle biologique a d'ailleurs permis de confirmer la conservation des méthodes de synthèse entre l'homme et la levure, chez laquelle les trois particules pré-ribosomiques ont été retrouvées (192). Cependant, alors que la transcription du pré-ARNr, ses modifications et clivages étaient de mieux en mieux décrits (1), l'assemblage des ribosomes restait le fruit de mécanismes inconnus, jusqu'à la découverte des facteurs trans. Originaires du cytoplasme mais capables de se lier à l'ADN, chez la levure (193) six catégories ont été initialement définies : Drs (Déficience en sous-unités ribosomiques), Nop (Protéines nucléolaires), Mak (Maintenance d'un plasmide tueur), Rrp (Maturation de l'ARN ribosomique), Kre (Résistance à un tueur), Ecm (Matrice extracellulaire), et Spb (Suppresseur de Pab), avec à chaque fois un numéro derrière le nom du gène, numéro relatif soit au poids moléculaire de l'élément, soit à l'ordre de sa découverte.

Un peu plus tôt, un autre élément indispensable à la formation du ribosome, un ARN de faible poids moléculaire associé à l'ARNr 28S, a été identifié comme un facteur clé des étapes précoces de l'assemblage des ribosomes : U3, le petit ARN nucléolaire (snoARN), un élément clé de la maturation du pré-ARNr (194). La petite ribonucléoprotéine du même nom a également été étudiée en détail, et plusieurs laboratoires sont parvenus à montrer qu'elle se liait au pré-ARNr 18S (195–197). D'autres snoARN ont été identifiés par la suite, comme U14 ou snR30, responsables d'autres coupures du produit initial pour former les trois produits matures. Ces snoARN coupent à des sites précis, nommés A0, A1 et A2 chez la levure (198), (199). In fine, près de 80 snoARN ont depuis été découverts, et regroupés en deux classes : les snoARN boîte C/D, au nombre de 45 environ, dont font notamment partie U3 et u14, qui ont pour la plupart un rôle dans la méthylation du 2'-O-ribose, qui a lieu à de nombreux sites de l'ARNr au cours de la transcription en association avec la fibrillarine, et une trentaine de snoARN boîte H/ACA, qui sont les guides de la pseudouridylation catalysée par la pseudo uridine synthase Cbf5 (200,201). De tous ces éléments impliqués résulte un nombre impressionnant de modifications : chez l'homme, 130 méthylations et pseudouridylation ont été visualisées sur la structure 3D du ribosome 80S (202).

## II.II. Du pré-ARNr 47S aux formes matures.

L'ADNr est donc transcrit en premier lieu en un seul produit, le pré-ARNr 47S. Celui-ci formera de nombreux précurseurs intermédiaires pendant la maturation des particules pré-40S (Figure 6, adaptée de (203)) ou pré-60S (Figure 7, adaptée de (203)).

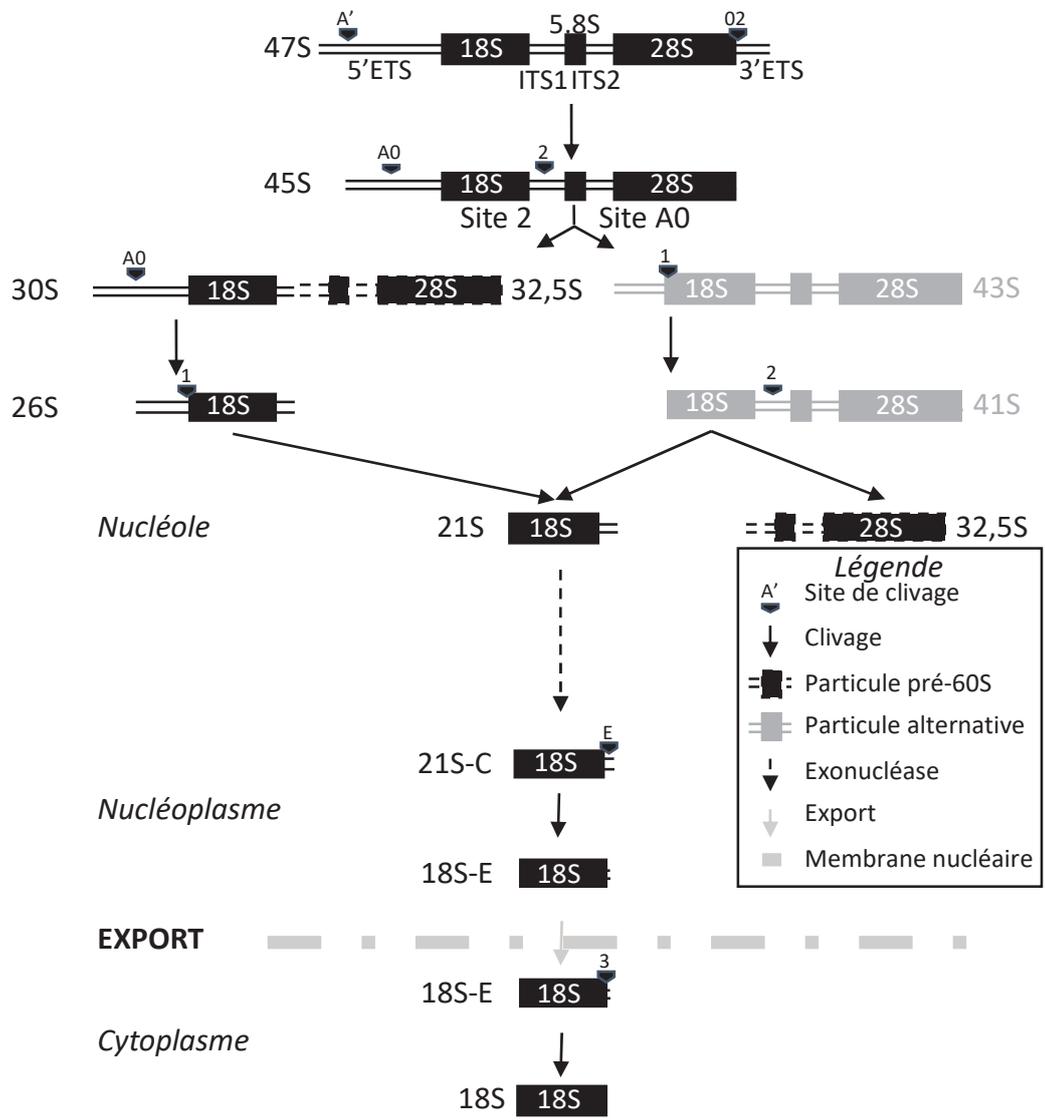
### *II.II.1 Maturation des particules pré-40S.*

Chez l'homme, de nombreuses protéines sont impliquées et ont des rôles très divers au cours de ce processus très complexe : récemment, près de 300 protéines ont été impliquées directement ou indirectement dans la maturation des particules pré-40S, dont 80% intervenant dans les étapes nucléolaires (204). Une des particularités est l'absence, à notre niveau actuel de connaissances, de clivages co-transcriptionnels, contrairement à la maturation pré-40S chez la levure ou la souris (205). Néanmoins, deux clivages ont lieu très tôt après la terminaison de la transcription du 47S : au niveau du site A' dans l'ETS 5', et au niveau du site O2 dans le 3'ETS. Privé de ses deux extrémités, le pré-ARNr 47S devient alors le 45S. Le 45S peut alors emprunter deux voies alternatives : dans l'une d'entre elles, le site 2, situé dans l'ITS1, subit un clivage, provoquant une séparation précoce des éléments qui aboutiront à la petite et à la grande sous-unité du ribosome. Ici, nous nous intéresserons au pré-ARNr 30S, compris dans les particules pré-40S. Cette voie semble être la plus

fréquemment utilisée, eu égard à l'abondance du 30S parmi les différents précurseurs ribosomiques. La maturation se poursuit avec le clivage du site A0 en 5', ce qui libère le pré-ARNr 26S, qui sera clivé au site 1, toujours en 5', pour donner le 21S. Le 21S se compose en 5' du 5' du futur ARNr 18S, et son 3' est composée par les 950 premiers nucléotides environ de l'ITS1 (206–208). L'endonucléase à domaine PIN hUTP 24 est responsable du clivage au site 1 du 26S (209), mais aussi au site E du 21S-C (210) qui amène à la forme 18S-E. C'est une autre endonucléase à domaine PIN, hUTP23, qui est impliqué dans le clivage A0 du 30S (211), et de manière intéressante, hUTP24 est requise pour que le clivage puisse se produire, mais sans que sa fonction ne soit nécessaire (209,210).

La voie alternative de clivage commence par deux clivages consécutifs : au site A0 en 5' du 45S pour donner le 43S, puis au site 1 en 5' de ce dernier pour former le 41S, qui consiste en l'entièreté du 47S mais sans les deux ETS. Le site E en 3' du futur 18S sera alors clivé par l'endonucléase MRP (207), laissant alors le 21S, qui signe le retour à la partie commune des deux voies de clivage. Après le clivage au site 2, le pré-ARNr 21S subira une coupure exonucléolytique en 3', jusqu'à une séquence extrêmement conservée de l'ITS1 chez les mammifères en dépit de la grande variabilité des ITS entre les espèces (212). Ce clivage donne naissance à la forme 21S-C, dont l'extrémité 5' est celle du futur 18S et l'extrémité 3' est située aux alentours du nucléotide 635 de l'ITS1 (206). Ce précurseur s'accumule en cas de déplétion de certains facteurs d'assemblage des ribosomes ou Riboprotéines, à savoir Bystine et RPS19 (206,208). Toutefois, RRP6, en tant que seule enzyme catalytique liée à l'exosome nucléolaire, semble être l'acteur majeur de cette étape de la maturation (213,214). Comme évoqué plus haut, le 21S-C sera ensuite clivé au site E par hUTP24 pour donner le 18S-E. Le site E correspond en réalité à deux points de clivages, après les nucléotides 78 et 81 de l'ITS1 (212). De manière intéressante, il peut arriver en l'absence de certains facteurs d'assemblage et/ou riboprotéines que le clivage au site E ait lieu avant le clivage au site 2, conduisant à une augmentation drastique de la quantité de 18S-E et du 36S, le « reste » du 41S après le clivage du site E (215,216). Cet état de fait reste minoritaire dans des cellules saines.

A partir de l'étape 18S-E, la production du 40S est délocalisée dans le noyau (217). Curieusement, c'est la ribonucléase spécifique des poly(A) (PARN), qui élague la partie ITS1 du 18S-E (218), alors qu'elle se lie préférentiellement aux adénosines et que les ITS ont un haut pourcentage de GC (219). Toutefois, l'intervention de la polymérase poly(A) PAPD5, qui rajoute des adénosines sur plusieurs ARN non codants et substrats de PARN (220–222), semblerait rendre l'ITS1 PARN-compatible (223). Une fois PARN libéré, l'extrémité 3' du 18S-E est dégradé par une exoribonucléase à ce jour inconnue. Après cette dégradation, le 18S-E peut se voir ajouter des extensions de 2 à 4 uridines par une 3' terminale uridyle transférase (TUTase) inconnue. Si le rôle exact de cet ajout n'est pas connu, l'oligo-uridylation terminale a récemment été associée à la maturation ou dégradation d'un certain nombre d'ARN (224,225). Dans ce cas de figure, elle pourrait guider une exoribonucléase cytoplasmique ou permettre à une étape de maturation tardive de se dérouler. Enfin, l'endonucléase à domaine PIN NOB1 va cliver la dernière partie d'ITS1 restante au 18S-E, au niveau du site 3, ce qui donnera le 18S mature. NOB1 fonctionne en présence du cofacteur ATPase hCINAP, du moins in vitro (226).



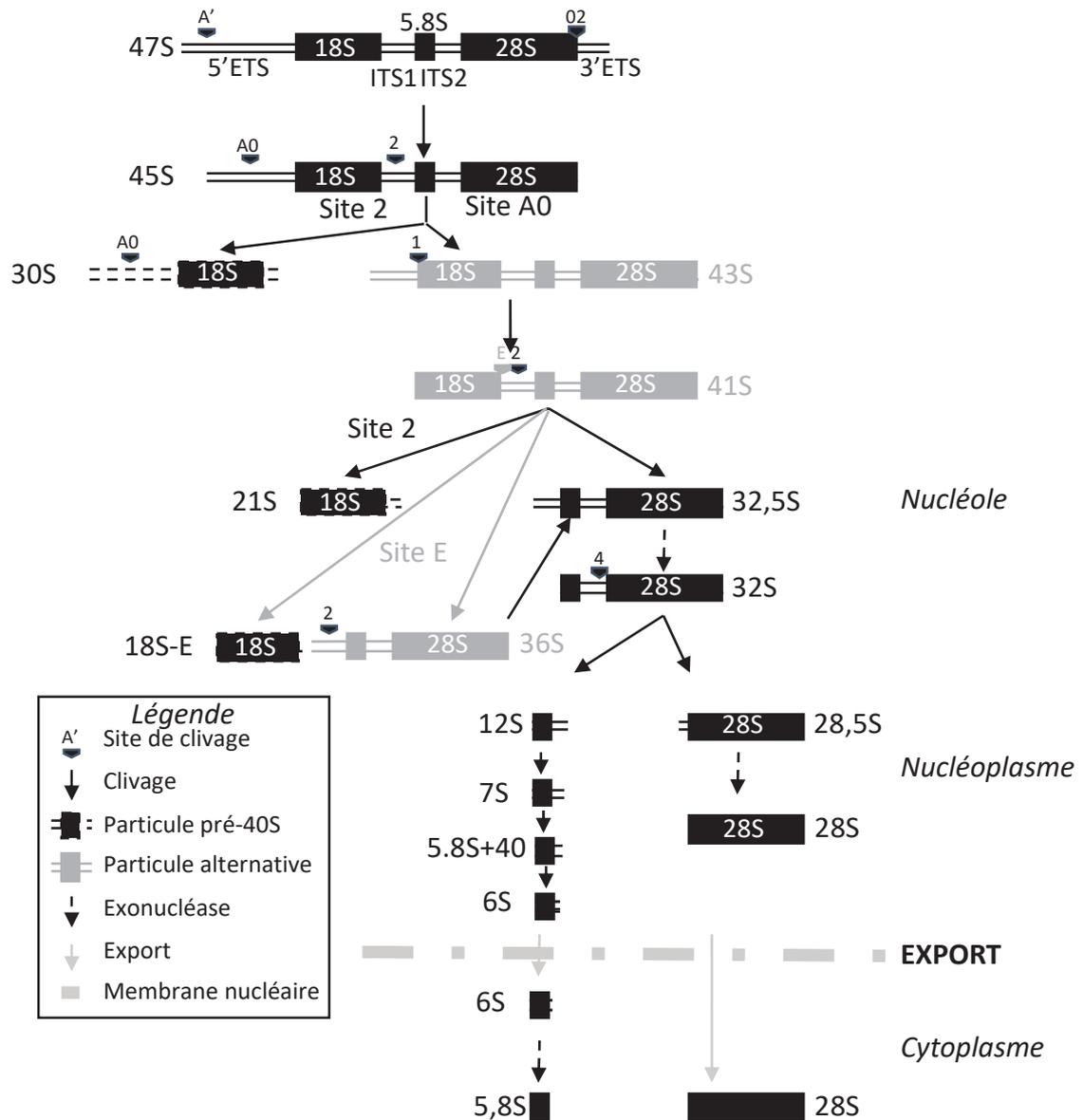
**Figure 6 : Schéma de la maturation des particules pré-40S.**

Le premier produit de transcription, l'ARNr 47S, sera clivé plusieurs fois ou dégradé par des exonucléases, ainsi qu'exporté dans d'autres compartiments cellulaires, pour former l'ARNr mature 18S.

### *II.II.2. Maturation des particules pré-60S.*

La grande sous-unité du ribosome comporte trois ARNr : le 28S et le 5.8S, issus du pré-ARNr 47S, et le 5S, transcrit par l'ARN Polymérase 3. Nous allons ici nous intéresser aux deux premiers. Les particules pré-40S et pré-60S sont séparées dès les premières étapes de la maturation, à la suite du clivage du site 2, situé dans l'ITS1. En plus du pré-ARNr 30S, ce clivage donne naissance au pré-ARNr 32.5S, précurseur du 5.8S et du 28S. Par la suite, l'intervention de l'exoribonucléase 5'→3' XRN2 dégrade le reste de l'ITS1 situé en 5' du transcrit 32.5S, ce qui conduit à la formation du pré-ARNr 32S (212,214). Un clivage au site 4, situé dans l'ITS2 et médié par l'endonucléase Las1 donnera naissance au pré-ARNr 12S, le précurseur du 5.8S, et au pré-ARNr 28.5S, le précurseur du 28S (227). C'est encore XRN2 qui élimine le restant d'ITS2 en 5' du 28.5S pour donner le 28S mature (228). La transition du 12S au 5.8S se déroule en plusieurs étapes : dans un premier temps, un transcrit plus court, le 7S, est formé suite à un clivage au site 4a chez la souris, situé dans l'ITS2 (229). Des formes intermédiaires entre les deux s'accumulent en absence de composants de l'exosome, dont les sous-unités catalytiques RRP6 et DIS3 (212) mais également des facteurs associés tels que MTR4, MPP6 et CD 1 (213,230). En l'absence de RRP6, on observe l'accumulation d'un intermédiaire nommé 5.8S+40 (5.8S+30 chez la levure) (230). L'exonucléase nucléolaire ISG20-L2 semble également être impliquée dans cette étape de la maturation (231). Enfin, chez la souris, ERI1, une exoribonucléase 3'→5' dégrade les quelques nucléotides qui séparent la forme transitoire 6S de la forme finale 5.8S (232). De façon intéressante, cette étape a lieu dans le cytoplasme chez la levure (233) et le Xénope (234), et ERI1 est une protéine cytoplasmique chez le nématode. Chez ce dernier, ERI1 n'est pas indispensable à la viabilité cellulaire, ce qui indique que la forme 6S reste compétente pour la traduction (235), contrairement à la souris où moins de 10% des embryons survivent, pour finalement mourir dans les deux jours qui suivent la naissance (232).

A l'issue de la maturation, les ARNr sont exportés dans le cytoplasme où ils entreront dans la composition des ribosomes matures, en association avec plusieurs dizaines de riboprotéines (Rp).



**Figure 7 : Schéma de la maturation des particules pré-60S.**

Le premier produit de transcription, l'ARNr 47S, sera clivé plusieurs fois ou dégradé par des exonucléases, ainsi qu'exporté dans d'autres compartiments cellulaires, pour former les ARNr matures 5,8S et 28S.

### III. Les dommages à l'ADN et leur réparation

La molécule d'ADN est stockée dans le noyau de nos cellules et porte toutes les informations génétiques nécessaires au développement et au bon fonctionnement du vivant. Il est donc crucial qu'elle soit correctement répliquée et transcrite. Ce qui n'est pas une mince affaire, étant donné que notre ADN est exposé à chaque instant à de nombreux assauts qui mettent en péril son intégrité. Ces attaques peuvent être divisées en deux catégories (236) :

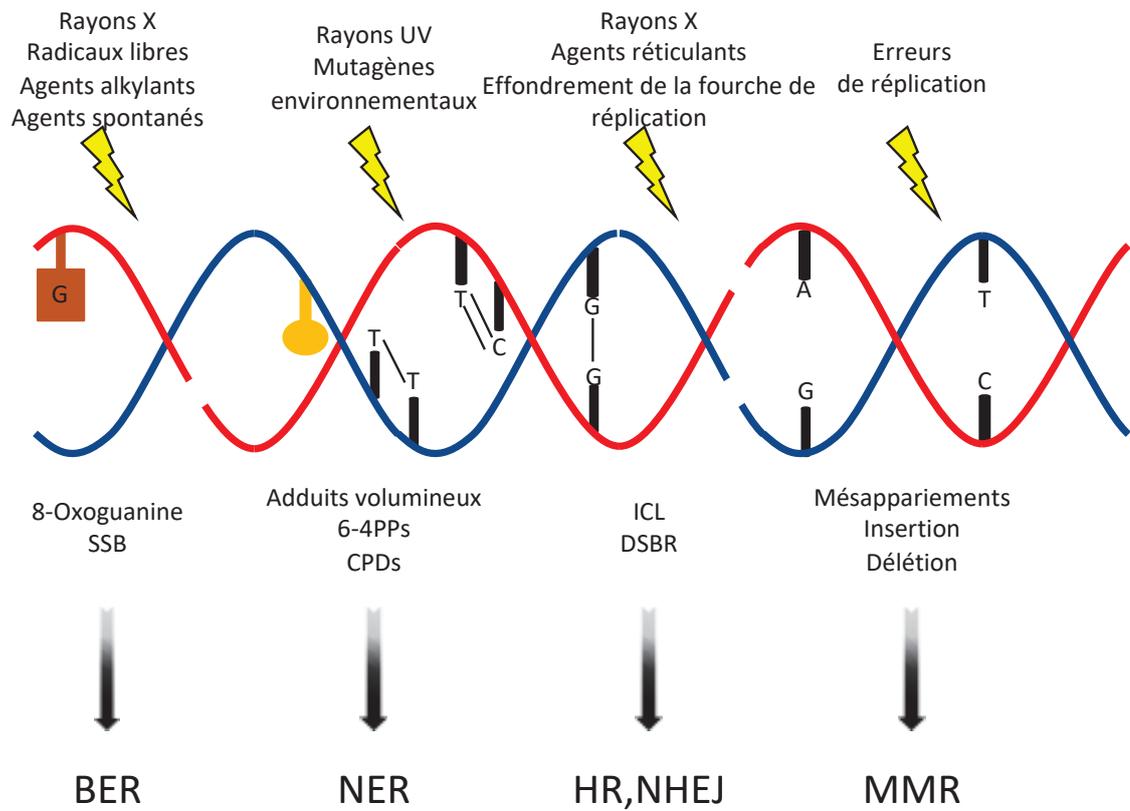
- Les facteurs endogènes, comme par exemple les Dérivés Réactifs de l'Oxygène (ROS), ou l'hydrolyse des liens entre les nucléotides.
- Les facteurs exogènes, comme par exemple certains produits chimiques ou la lumière ultraviolette (UV).

Une lésion peut affecter un seul ou les deux brins de la molécule d'ADN, avec des conséquences variables. Si elle touche un brin en cours de transcription, une lésion conduira à des mutations irréversibles, qui peuvent par exemple provoquer des cancers (237). Dans d'autres cas de figures, une lésion peut bloquer le processus de transcription ou de réplication, ce qui activera la mort cellulaire ou le mécanisme de sénescence, conduisant à un vieillissement accéléré. (236). Les atteintes endogènes se chiffrent à environ  $10^5$  lésions par cellule et par jour (238), rendant capitale la nécessité de s'en prémunir. Pour ce faire, la cellule a développé plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Cette boîte à outils comporte cinq systèmes majeurs de réparation (Figure 8, adaptée de (237)), avec chacun des visées différentes.

#### III.I. La réparation des cassures double brins

##### *III.I.1. La réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)*

Les cassures double brins sont causées par des facteurs exogènes tels que les rayons X, mais peuvent également apparaître suite à l'effondrement d'une fourche de réplication lorsqu'elle rencontre une lésion simple brin non réparée. Chaque jour, on estime à environ dix par cellule le nombre de cassures double brins (239). Le système NHEJ peut être mis en place en parallèle de la réparation du dommage à l'ADN, puisqu'il recolle simplement les deux extrémités de la lésion. Le dimère Ku, composé de Ku70 et Ku80, reconnaît la lésion et se lie à l'ADN. Cette liaison de Ku va renforcer l'affinité pour l'ADN, déjà importante, de la sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PKcs) (240). Une nucléase, Artemis, existe en complexe avec DNA-PKcs et est recrutée simultanément (241), afin de cliver la lésion et de préparer les extrémités à la ligation. Les Polymérase de la famille de Pol X,  $\mu$  et  $\lambda$ , ajoutent les nucléotides nécessaires, avant que le complexe de la ligase DNA IV, qui inclut XRCC4, XLF (242) et PAXX (243), ne prenne en charge l'étape critique de la ligation des brins. Cependant, ce système de réparation conduit fréquemment à des erreurs : des bases azotées peuvent être ajoutées ou retirées pendant la ligation. Au rang des conséquences plus délétères, on trouve également des translocations, dans le cas où des cassures double brins d'endroits différents du génome sont liées l'une à l'autre. Toutefois, ce défaut du NHEJ peut être mis à profit par notre organisme, par exemple dans le cas de la recombinaison V(D)J. En effet, les erreurs du NHEJ permettent une grande variabilité de la région déterminant la complémentarité (CDR) 3, ce qui permet in fine la formation d'une multitude de sites de détection de l'antigène (244). La variabilité du récepteur des cellules T dépend d'un mécanisme similaire.



**Figure 8 :** Les sources de lésions de l'ADN, le type de dommage induit et le système de réparation employé.

La cellule dispose de nombreux systèmes de réparation afin de pouvoir s'adapter aux multiples types de dommages qui l'affectent. SSB : Cassure simple-brin ; 6-4PPs : Dimère 6-4 pyrimidine-pyrimidone ; CPDs : Dimère cyclobutane pyrimidine ; ICL : Réticulation inter-brins ; DSBR : Cassure double brins ; BER : Réparation par excision de base ; NER : Réparation par excision de nucléotide ; HR : Recombinaison homologue ; NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues ; MMR : Réparation des mésappariements.

### *III.1.2. La recombinaison homologue (HR)*

La recombinaison homologue est le second système de réparation des cassures double brins. Contrairement au système NHEJ, il est garanti sans erreur puisqu'il aligne la lésion à la séquence correspondante sur le chromosome homologue et se sert de ce dernier comme d'un modèle pour une réparation sans erreur (245). Dans ce mode de réparation, c'est le complexe MRN, constitué de Mre11, Rad50 et Nbs1, qui reconnaît le dommage en se liant aux extrémités de l'ADN où la cassure est située. Intervient ensuite une étape dite de résection : d'abord, CtIP active le complexe MRN qui dégrade les nucléotides à proximité, puis l'exonucléase Exo1 associée au couple hélicase-endonucléase BLM-DNA2 étend ces régions simple brin orientée 3' sur plusieurs kilobases (246). Ces régions 3' libres serviront au recrutement de Rad51, via une interaction avec RPA et BRCA2 (247). Rad51 est la molécule centrale de la recombinaison homologue. Des filaments de Rad51 vont envahir les séquences proches à la recherche d'homologie. Rad51 requière un minimum de 8 nucléotides similaires, et le taux minimal de dissociation est observé lorsque la similarité s'étend à 15 nucléotides. Une fois l'homologie trouvée, une structure appelée D-loop est générée entre le brin 3' libre et la séquence homologue. Rad54 permet la transition entre l'invasion de brins et la synthèse d'ADN en dissociant le filament de Rad51 de l'ADN (248,249). Plusieurs modes de terminaison sont alors possibles : la voie de la Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA) où le brin invasif est étendu par une polymérase, avant d'être désassemblé et réhybridé à l'autre brin pour générer une réparation sans cross-over, la réplication induite par une cassure (BIR), qui transforme la cassure en une véritable fourche de réplication et une dernière voie où le second brin impliqué dans la cassure peut être capturé pour former une double jonction de Holliday, qui pourra donner lieu à des événements de réparation avec ou sans cross-over.

En revanche, la recherche d'homologie prend un certain temps à la cellule, et le mécanisme HR est donc moins flexible que le NHEJ. En conséquence, il est plutôt utilisé après la réplication de l'ADN, quand la chromatide sœur est disponible pour servir de patron. De façon intéressante, une forme de recombinaison homologue associée à la transcription (TA-HRR) a été récemment décrite (250) et pourrait être impliquée dans la réparation des R-loops, des structures hybrides composées de deux brins d'ADN entremêlés à un brin d'ARN nouvellement synthétisé. Lors de la mise en place du TA-HRR, les R-loops sont incisés pour former une cassure double brin, qui sera ensuite réparée par le système HR. Ce mécanisme permet une réparation sans erreurs des régions touchées par les R-loops.

### *III.II. La réparation des lésions simple brin*

#### *III.II.1. La réparation des mésappariements (MMR)*

Il peut arriver que deux nucléotides soit incorrectement appariés, suite à des erreurs de polymérase, la recombinaison entre les ADN parentaux alléliques, ou simplement suite à un dommage physique ou chimique (251). Le système MMR corrige ces appariements aberrants dans un brin nouvellement synthétisé. Afin de faire la différence entre les deux brins, le système MMR se repose sur la reconnaissance de méthylations de bases spécifiques, présentes sur le brin mère mais absentes sur le brin néo synthétisé. Les protéines homologues Mut sont en charge du MMR. Suite à la détection de la lésion, l'ADN sera incisé quelques nucléotides en amont et en aval de celle-ci, avant que la séquence erronée soit retirée. La lacune ainsi formée sera comblée par la machinerie répliquative et la séquence correcte liée aux deux extrémités par une ligase ADN (252).

### III.II.2. La réparation par excision de bases (BER)

Le BER répare les lésions causées par l'oxydation, la déamination ou l'alkylation des bases, qui ne déforment pas la double hélice d'ADN (253). Ces lésions sont détectées par onze glycosylases ADN, différentes selon la lésion : quatre d'entre elles détectent les uraciles et thymines mésappariées, six autres se concentrent sur les dommages oxydatifs, tandis que la dernière détecte les bases alkylées (254). Suite à l'action de la glycosylase, le site abasique ainsi créé est excisé, et une incision a lieu parmi les nucléotides alentour, créant une cassure simple brin. La Polymérase  $\beta$ , spécifique de ce cas de figure, synthétise la séquence nucléotidique correcte en se servant du brin intact comme d'un patron, et une ligase ADN achève la réparation de la lésion (253).

### III.II.3. La réparation par excision de nucléotides (NER)

Le NER est un système de réparation extrêmement polyvalent, qui répare plusieurs catégories de lésions qui déforment l'hélice d'ADN, qui n'ont pourtant pas grand-chose en commun : les adduits chimiques volumineux comme ceux induits par la fumée de cigarette ; les dimères cyclo butane pyrimidine (CPD) ou les dimères 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4PPs), tous deux induits par le rayonnement UV ; les réticulations inter-brins (ICL) ; certaines formes de dommages oxydatifs (236). Plus de 30 protéines sont impliquées dans ce processus dit de « scission-réparation » (255). Il est divisé en deux mécanismes : la réparation du génome global (GGR) ou la réparation couplée à la transcription (TCR). Une étape de détection spécifique est suivie par un arbre commun.

#### III.II.3.A. La détection de la lésion

Pour le GGR, deux cas de figures se présentent : si la lésion déforme beaucoup la double hélice, ce qui est le cas par exemple d'un 6-4PP, alors la protéine XPC est suffisante pour détecter le dommage. Dans le cas contraire, comme par exemple pour les CPDs, la double hélice n'est que légèrement déformée. Le complexe protéique XPE-DDB1 doit alors venir se greffer sur le CPD, afin d'augmenter la déformation de la double hélice, ce qui permet le recrutement d'XPC (256). De fait, les protéines XPC et XPE sont exclusives au GG-NER, et même lorsqu'elles sont dysfonctionnelles ou absentes, le TCR fonctionne toujours. Dans le cas de ce dernier, la détection implique la protéine Cockayne Syndrome B (CSB). De manière basale, elle interagit avec l'ARN Polymérase 2 (RNAP2) (257) et cette interaction s'intensifie en présence d'une lésion bloquant la RNAP2 (258). La protéine Cockayne Syndrome A (CSA) est également recrutée sur le site de la lésion, et possède apparemment des fonctions d'ubiquitineuse (259). Une ubiquitinylation précise de toutes les protéines impliquées dans le TCR est indispensable à la modulation de leurs interactions et de leurs fonctions. Il est à noter que le TCR est en charge de la réparation des lésions empêchant la progression de l'ARN Polymérase 1 (RNAP1) sur l'ADN ribosomique (ADNr) comme récemment démontré (188).

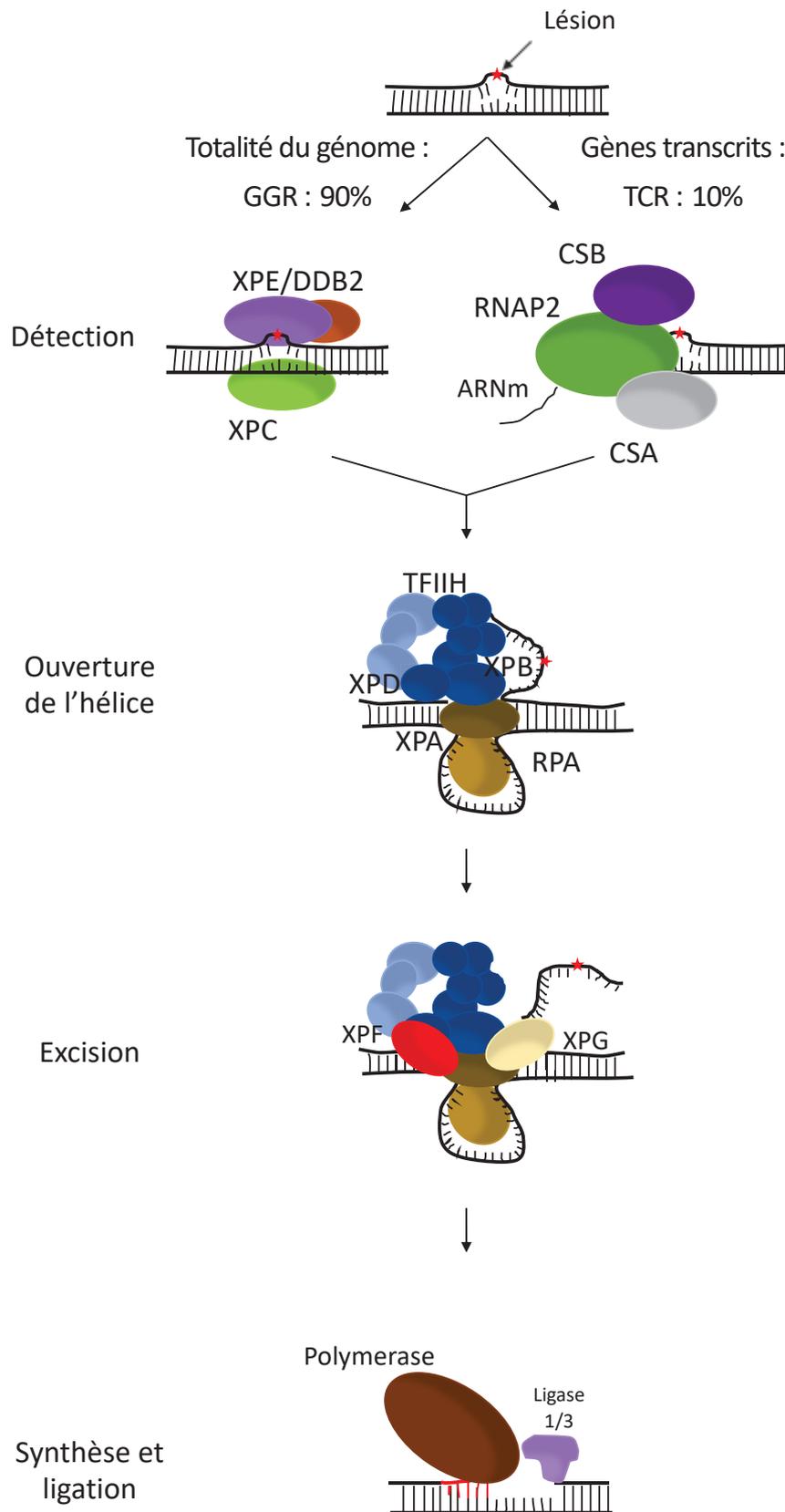
#### III.II.3.B. L'ouverture de la double hélice

Les étapes subséquentes à la détection de la lésion sont communes au GGR et au TCR. Elles impliquent un complexe protéique aux multiples rôles : TFIIH. Il est composé de dix protéines, divisées en deux catégories : sept protéines dites du « core », XPB, p62, p44, p52,

p34, TTDA et XPD, qui fait le lien entre le core et les trois protéines kinases associées aux cyclines (CAK), à savoir la Kinase dépendant des cycline 7 (CDK7), Menage a Trois 1 (MAT1) et la Cycline H (260). XPB est une hélicase 3'-5', qui est régulée par p52 et TTDA, et XPD est son pendant 5'-3', régulée par p44. P62 et p34 ont un rôle structurel. XPB possède une activité ATPase, grâce à laquelle il ancre TFIIH à l'ADN endommagé en rapprochant deux motifs structuraux via hydrolyse de l'ATP (261). Suite à cet ancrage, XPD examine l'ADN jusqu'à localiser la lésion et ouvre l'hélice avec une activité hélicase mue par sa fonction ATPase (262). TTDA stimule l'activité ATPase d'XPB, et favorise également le recrutement de la protéine XPA (263), qui interagit avec TTDA et p52 à une des extrémités de la bulle NER (264). XPA vérifie la lésion et favorise le déroulement de l'ADN par le core de TFIIH, tout en inhibant l'activité hélicase (265). Les protéines du CAK sont libérées de TFIIH, pour éviter qu'elles ne gênent la réparation (266). RPA est recrutée en interagissant avec XPA, et va recouvrir le brin non endommagé afin de le préserver (267).

### III.II.3.C. Double incision et étapes finales

Guidés par XPA et RPA, XPF et XPG sont recrutés pour inciser l'ADN, respectivement en position 5' et 3' de la lésion (268,269), conduisant à l'élimination d'un segment long d'un peu moins de trente nucléotides. XPG intervient le premier, un peu avant XPF, formant un complexe de préincision avec RPA, XPA et TFIIH. L'activité endonucléase d'XPG n'est cependant activée qu'une fois que la protéine XPF a procédé à l'incision en 5', et l'incision en 3' intervient en second lieu. Une fois les deux incisions effectuées, le brin endommagé est libéré, et TFIIH part avec lui. Au niveau du groupe hydroxyle libre laissé par XPF en 3', la Polymérase  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\kappa$ , selon la situation de la cellule (270), puis la Ligase I ou III, toujours selon la situation de la cellule, achèvent ce processus de réparation.



**Figure 9 : Le mécanisme moléculaire du NER.**

Le NER peut être divisé en deux sous-voies, qui se différencient par l'étape de détection. Toutes les étapes suivant la détection sont communes aux deux voies. GGR: Réparation du génome global ; TCR : Réparation couplée à la transcription ; RNAP2 : ARN Polymérase 2 ; ARNm : ARN messager.

#### IV. Les syndromes liés à un défaut du NER

Étant donné que notre ADN subit constamment des dommages, les systèmes en charge de la réparation doivent être fonctionnels en permanence. Le non fonctionnement d'un ou plusieurs systèmes de réparation cause l'apparition de syndromes présentant de graves signes cliniques chez les patients concernés. Nous nous intéresserons ici uniquement aux syndromes causés par un défaut du système de réparation NER. Il est important de retenir que la mutation d'une même protéine peut causer un ou plusieurs syndromes simultanément, reflétant les multiples rôles des protéines du système NER. Les principaux syndromes liés à un défaut du système de réparation par excision de nucléotides sont le syndrome *Xeroderma Pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS), le syndrome Cérébro-Oculo-Facio-Squelettique (COFS), le Syndrome UV-Sensitif (UVSS) et la Trichothiodystrophie (TTD). Certaines mutations vont causer une combinaison d'XP et de CS, mais il existe également une forme dite « XP avec atteinte neurologique » et une combinaison d'XP et de TTD (271,272).

Tous ces syndromes ont pour socle commun une sensibilité accrue du patient au rayonnement UV, puisque le NER est en charge de la suppression des adduits volumineux induits par l'exposition aux UV. En plus de cette hypersensibilité aux UV, la prévalence des cancers de la peau est beaucoup plus élevée chez les patients XP ; les patients CS et COFS présentent des atteintes neurologiques ainsi que des caractéristiques de vieillissement prématuré ; les patients TTD présentent des cheveux au motif tigré sous la lumière polarisée. Globalement, un simple déficit du système NER ne peut pas expliquer une telle variabilité de symptômes. Une atteinte des processus transcriptionnels dans lesquels sont impliqués les protéines du NER pourrait expliquer ces différents syndromes (273). Quoi qu'il en soit, la relation génotype-phénotype doit être étudiée en profondeur afin de mieux comprendre l'étendue du spectre de ces syndromes.

##### IV.I. Xeroderma Pigmentosum

*Xeroderma Pigmentosum* est un syndrome rare, autosomique et récessif, qui touche environ une personne sur un million aux Etats-Unis, 4 personnes sur un million en Europe et environ 1 pour 100 000 au Japon. Caractérisé pour la première fois en 1874 par le dermatologue autrichien Moritz Kaposi, son nom provient du grec. *Xeroderma* signifie peau sèche, tandis que *Pigmentosum* indique les défauts dans la pigmentation causés par la maladie. En effet, les patients développent très tôt des grains de beauté, ainsi que de la poïkilodermie, une alternance de région hypo- et hyperpigmentées sur leur peau, et de la télangiectasie, l'apparition de taches rouges sur la peau dues à l'accumulation de vaisseaux sanguins (274). De plus, ce syndrome est associé à une fréquence très élevée de développement de cancers de la peau : comparé à un patient sain, un patient atteint par XP a 2 000 fois plus de risques de développer un mélanome de la peau, et 10 000 fois plus de risques de développer un cancer non mélanocytaire de la peau (275). De plus, ces cancers apparaissent très tôt, en général avant la dixième année, suite à une exposition au rayonnement UV solaire (276). A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour XP. Néanmoins, avec des protections adaptées contre le rayonnement UV et si le patient est atteint d'une forme sans atteinte neurologique, le pronostic est généralement bon.

Le syndrome XP est causé par la mutation d'un gène XP. Il existe sept formes de la maladie, ou groupes de complémentation, du *Xeroderma Pigmentosum* de type A jusqu'au *Xeroderma Pigmentosum* de type G, chaque forme étant plus ou moins sévère selon le gène muté et le type de mutation. Il existe également une huitième forme, appelée Variant du

*Xeroderma Pigmentosum* (XPV), qui est causée par une mutation du gène POLH qui code pour la Polymérase  $\eta$ , impliquée dans la synthèse translésionnelle, c'est-à-dire la réplication de l'ADN à travers des sites endommagés (277). En cas de suspicion de *Xeroderma Pigmentosum*, le test diagnostique le plus fréquent est le test de la synthèse d'ADN non programmée, ou UDS. Des nucléotides marqués sont incorporés dans des cellules, et celles-ci sont ensuite irradiées aux UV, afin d'activer le système NER. Dans des cellules saines, les nucléotides marqués seront intégrés lors de la réparation, et la mesure de cette incorporation reflète l'activité du NER. Tous les patients des formes traditionnelles de XP ont un niveau UDS plus faible. Les patients XPV ne présentent pas de défauts du NER, mais leurs cellules sont hypersensibles aux UV en présence de caféine, offrant ainsi une alternative de dépistage aisée (278).

Les patients XP souffrent également fréquemment de problèmes oculaires : une étude au long-court, s'intéressant à des patients XP sur presque cinquante ans, a démontré que 91% de 87 patients XP développaient un problème oculaire (279). De plus, 24% de 106 patients admis aux National Institutes of Health entre 1971 et 2009 présentaient une dégénérescence neuronale progressive. 64% de ces patients étaient atteints par un *Xeroderma Pigmentosum* de type D (275) XPD est une protéine très importante pour le complexe TFIIH, très impliqué notamment dans la transcription, ce qui tend à prouver que les formes les plus graves sont souvent liées à la perturbation d'autres processus en plus de la perturbation du NER. Cette étude a également démontré un décès intervenant plus tôt en cas d'atteinte neuronale associée à XP (29 ans, contre 37 sans problèmes neuronaux). Lorsque présents, ces symptômes de dégénérescence sont d'ailleurs la cause numéro 1 des décès, devant même les cancers de la peau.

Enfin, les patients avec une mutation du gène codant pour XPB, XPD, XPF ou XPG, peuvent être atteints par une forme combinée du *Xeroderma Pigmentosum* et du Syndrome de Cockayne (XP/CS), avec un pronostic encore plus délétère que celui des patients atteints par un XP avec atteinte neurologique (280). Dans cette étude, sur les 43 patients atteints par XP/CS, 21 avaient un XP de type G. Ces formes sévères présentant les caractéristiques des deux syndromes pourraient être associées à des mutations codant pour des formes tronquées de la protéine XPG, incapable de stabiliser TFIIH, tandis que les formes avec une mutation ponctuelle du gène codant pour la protéine XPG causeraient simplement une déficience du NER, et donc un « simple » *Xeroderma Pigmentosum* de type G (281).

#### IV.II. Syndrome de Cockayne

Tout comme le *Xeroderma Pigmentosum*, le syndrome de Cockayne (CS) est une maladie rare, autosomique et récessive, qui concerne environ 2.7 naissances sur un million en Europe. Elle a été décrite pour la première fois en 1936 par Edward Cockayne comme une maladie causant un « Nanisme avec une atrophie rétinienne ainsi que de la surdité ». En effet, CS provoque des retards de croissance et de développement, ainsi qu'une microcéphalie. Un autre signe clinique très reconnaissable du CS est le faciès « desséché » (282). La perte du gras sous-cutané creuse les yeux et les joues. Quant à la microcéphalie, elle est causée par une démyélinisation en bandes des neurones, dite « leucodystrophie tigröide » (283). En tant que syndrome lié au NER, le CS cause une photosensibilité. Toutefois, il n'augmente pas la prévalence des cancers, contrairement à XP. Cette différence majeure pourrait être expliquée par la non-apparition de mutations consécutives à l'exposition aux UV dans les cellules CS (284). Une autre explication tient dans l'aspect progéroïde de CS : la sénescence des cellules ayant subi des dommages à l'ADN pourrait protéger les patients CS du cancer (285).

Le syndrome de Cockayne est causé par une mutation du gène CSA ou CSB, qui codent pour les protéines du même nom. Comme évoqué précédemment, CS peut également être provoqué, en combinaison avec XP, par des mutations de XPB, XPD, XPF et XPG. On parle de groupes de complémentation pour CS également, mais il en existe deux uniquement : A et B. La maladie présente trois phénotypes : le type 1 est la forme classique de la maladie, avec une émergence des symptômes aux alentours des 1 an ; le type 2 est plus sévère et les symptômes sont présents à la naissance ; enfin, le type 3 est la forme la moins grave, avec une émergence des symptômes durant l'enfance. Les mutations du gène CSA conduisent principalement au Type 1 de la maladie, tandis que les mutations de CSB conduisent au type 2 (286). En règle générale, l'espérance de vie et la sévérité des symptômes sont corrélés à l'âge d'apparition des premiers symptômes, mais il existe des exceptions.

De plus, des syndromes précédemment considérés comme des entités à part entière, sont dorénavant considérés comme des syndromes du spectre CS : le syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique (COFS), dont les patients présentent les symptômes du CS de Type 2 associés à de l'arthrogrypose (286), et le syndrome de sensibilité aux UV (UVSS), dont les patients ne présentent pas d'atteintes neurologiques mais seulement une hypersensibilité aux UV, une sécheresse de la peau et des taches de rousseur (287). Les causes génétiques de COFS sont multiples : une mutation amenant à la perte de fonction des protéines CSB, XPD, XPG ou ERCC1 (288–291), et les symptômes peuvent parfois être détectés même pendant la grossesse (292). L'arthrogrypose caractéristique des patients COFS pourrait être due à une akinésie fœtale causée par une émergence encore plus précoce des atteintes neurologiques d'un CS de type 2 (286).

Situé à l'opposé du spectre des syndromes CS, UVSS peut être causé par une mutation de CSA, CSB ou UVSS-A (293,294). Il s'agit de la forme la moins grave pouvant être causée par la mutation des gènes CS, puisque les patients sont totalement libérés de toute atteinte neurologique. Il reste toutefois à prouver si les patients souffrent de l'émergence tardive d'un déclin cognitif, de perte d'audition ou d'autres symptômes du syndrome de Cockayne au cours de leur vieillissement. Bien qu'apparentés au spectre CS, les CS et UVSS méritent néanmoins une attention particulière.

Les protéines CSA et CSB sont impliquées uniquement dans le NER couplé à la transcription, et des cellules avec une mutation des gènes codant pour ces protéines sont encore capables d'effectuer le GG-NER. Le diagnostic d'un syndrome de Cockayne implique une expérience de récupération de la synthèse d'ARN (RRS) : à l'issue de la réparation d'une lésion sur un gène transcrit, la transcription de ce dernier reprend. Il est possible de quantifier cette reprise de la transcription en mesurant l'incorporation de nucléosides marquées. En cas de mutation de CSA ou CSB, les lésions des gènes transcrits ne sont pas détectées, et donc pas réparées : le signal RRS est alors nul.

Le pronostic de la maladie dépend de sa sévérité. 65% des patients ont une mutation de CSB (295), qui conduit le plus souvent à un CS de Type 2, l'âge moyen de la mort est donc de douze ans (296). A l'heure actuelle, il existe seulement des traitements pour les symptômes, et aucun moyen de stopper ou même de ralentir la progression de la maladie. Le syndrome de Cockayne a été récemment associé aux maladies mitochondriales, avec lesquelles il partage de nombreux symptômes : l'ataxie, les convulsions, la myopathie, la surdité, la neuropathie, les retards de croissance, l'atrophie cérébelleuse, les défauts des noyaux gris centraux et la leucodystrophie (297). L'acidose lactique, observée dans plus de 40% des maladies mitochondriales, est également observée chez des patients CS (298). Enfin, les sites de contact membranaires (MCS) associées aux mitochondries permettent le bon échange des métabolites requis pour la synthèse neuronale, et les maladies mitochondriales,

par la perturbation de ces sites, mettent en péril l'homéostasie neuronale et provoquent la neurodégénérescence, symptôme majeur du CS (299). Dans ce contexte, il a récemment été démontré qu'un traitement avec un produit imitant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) contribuait à partiellement supprimer les défauts de la neurogenèse dans des lignées cellulaires de patients CS (300).

#### IV.III. Trichothiodystrophie

Le terme Trichothiodystrophie a été utilisé pour la première fois en 1980 par Vera H. Price pour décrire les anomalies capillaires des patients affectés par cette maladie autosomique rare et récessive à la prévalence inconnue. En effet, les cheveux courts, fragiles et épars des patients TTD sont caractérisés par un motif « queue de tigre » (une alternance de bandes claires et sombres) sous une lumière polarisée. Leurs ongles sont cassants, et ces deux symptômes sont les conséquences d'une synthèse anormale de sulfures contenus dans la kératine (301). Les patients TTD présentent également des retards de croissances ainsi que des retards mentaux. A la naissance, ils sont de plus atteints d'ichtyose, symptôme qui disparaît au cours des premières semaines de vie (302). Environ la moitié des patients souffrent en outre de photosensibilité, et leur syndrome sera placé dans la catégorie Trichothiodystrophie Photosensible (TTDP), tandis que l'autre moitié des patients n'est pas atteinte de photosensibilité, et sera dans la catégorie Trichothiodystrophie Non photosensible (TTDN). Les cancers de la peau sont rares dans les formes TTDN.

Une TTDP peut être causée par une mutation du gène codant pour la protéine XPB, XPD ou TTDA, trois protéines du core TFIIH, essentiel pour le NER mais aussi pour la transcription (303). Environ 20% des TTDN sont causées par une mutation du gène MPLKIP (303,304), dont le rôle n'est pas clair pour le moment. Il interagit toutefois avec l'ARNPol2, mais aussi avec SBDS, une protéine très conservée qui joue un rôle essentiel dans la biogénèse des ribosomes (304). Le spectre clinique de TTD est large : il existe la TTD IBIDS (ou type E), qui regroupe des formes présentant les symptômes suivants : ichtyose, cheveux cassants, déficit cognitif, fertilité réduite et petite taille. Les formes photosensibles sont classifiées comme PIBIDS (ou type F). Certaines formes ne présentent pas d'ichtyose et sont dites BIDS ou type D.

La présence de cheveux cassants ou d'anomalies de la tige de cheveux peuvent indiquer un TTD. Pour confirmer le diagnostic, il faut observer un cheveu sous le microscope : la présence du motif en queue de tigre indique de façon certaine un TTD (305). De plus, les cheveux des patients TTD contiennent une dose réduite de soufre ou de cystine, et les patients atteints de forme photosensibles présentent également des défauts du NER. Un patient TTD de moins de 10 ans a un risque de décès vingt fois plus élevé que la moyenne de la population américaine (305), et comme pour les autres syndromes du NER, il n'existe aucun traitement curatif.

Certaines mutations du gène codant pour XPB ou pour XPD peuvent provoquer une forme combinée d'XP et de TTD. Comme dans le cas des formes XP/CS, il a été suggéré qu'une protéine dont le rôle dans l'activité transcriptionnelle est affecté donnera une forme XP/TTD, tandis qu'une protéine qui ne peut « simplement » pas participer au NER donnera un Xeroderma Pigmentosum de type B ou D (306). Le tableau 4 récapitule les différents syndromes liés à un défaut du NER, les gènes impliqués dans ces syndromes et les symptômes causés par ces maladies.

Syndrome	Gène pouvant être muté	Symptômes
<i>Xeroderma Pigmentosum</i> (Variant) (XP)	XPA, ERCC3/XPB, XPC, ERCC2/XPD, DDB2/XPE, ERCC4/XPF, ERCC5/XPG, (POLH)	Hypersensibilité aux rayons UV, lésions de la peau et des yeux, fréquence élevée de cancers de la peau
<i>Xeroderma Pigmentosum</i> avec atteinte neurologique	XPA, ERCC3/XPB, ERCC2/XPD, ERCC5/XPG, ERCC5/XPG	Hypersensibilité aux rayons UV, lésions de la peau et des yeux, fréquence élevée de cancers de la peau, retard mental et atrophie cérébrale
Syndrome de Cockayne (CS)	ERCC8/CSA, ERCC6/CSB	Hypersensibilité aux rayons UV, retards de croissance, dysmorphie faciale, microcéphalie, défauts neurologiques et dégénérescence cognitive
Syndrome Cérébro-Oculo-Facio-Squelettique (COFS)	ERCC6/CSB, ERCC2/XPD, ERCC4/XPF, ERCC5/XPG	Hypersensibilité aux rayons UV, arthrogrypose, retards de croissance, dysmorphie faciale, microcéphalie, défauts neurologiques et dégénérescence cognitive
Syndrome d'hypersensibilité aux UV (UVSS)	ERCC8/CSA, ERCC6/CSB, UVSS-A	Hypersensibilité aux rayons UV, dépigmentation, lentignes solaires
Trichothiodystrophie (Photosensible) (TTD)	ERCC3/XPB, ERCC2/XPD, GTF2H5/TTDA	Hypersensibilité aux rayons UV, cheveux et ongles cassants, retards de croissance, déficit intellectuel
<i>Xeroderma Pigmentosum</i> & Syndrome de Cockayne (XP/CS)	ERCC3/XPB, ERCC2/XPD, ERCC4/XPF, ERCC5/XPG	Symptômes de <i>Xeroderma Pigmentosum</i> et du syndrome de Cockayne
<i>Xeroderma Pigmentosum</i> & Trichothiodystrophie (XP/TTD)	ERCC3/XPB, ERCC2/XPD	Symptômes de <i>Xeroderma Pigmentosum</i> et de la Trichothiodystrophie

**Tableau 4 : Récapitulatif des différents syndromes affectant la réparation de l'ADN.**

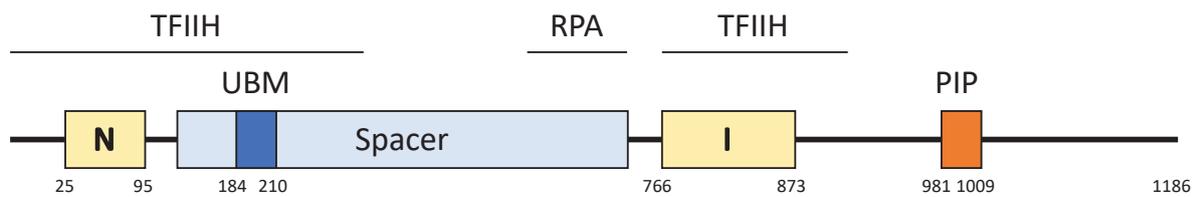
Pour chaque syndrome sont indiqués les gènes pouvant être mutés, ainsi que les principaux symptômes causés par le syndrome en question.

## V. La protéine XPG et ses différents rôles

XPG est une endonucléase 3' simple brin. Elle est codée par le gène *ERCC5*, qui est situé sur le bras long du chromosome 13, en position q33.1. La séquence protéique est composée de 1186 acides aminés, divisés en différents domaines (Figure 10) : de la position 25 à 95, le domaine N est un premier domaine nucléase. Le second domaine nucléase est appelé I et se situe entre les acides aminés (aa) 766 et 873. Ces deux domaines nucléases font d'XPG un membre de la famille des Flap Endonucléases 1 (FEN-1) (307). Trois acides aminés sont indispensables à l'activité catalytique d'XPG : Glu77, Glu791 et Asp812. La mutation d'un de ces trois résidus conduit à l'inactivité catalytique de la protéine XPG (308). Entre N et I, on retrouve le domaine Spacer, qui s'étend sur 600 acides aminés. La région entre l'aa 111 et 550 est responsable de l'interaction avec TFIIH (309) ; une interaction indispensable pour le fonctionnement du NER (310). Les aa 184 à 210, en particulier, sont très conservés chez les eucaryotes supérieurs et forment le domaine de liaison à l'ubiquitine (UBM) (311). Les aa 747 à 928 sont également impliqués dans l'interaction avec XPB, XPD, p62 et p44, des composants du core de TFIIH (312), mais en leur absence, XPG peut tout de même être recruté par TFIIH, ce qui n'est pas le cas en l'absence de la région 111-550 (309). XPG interagit également directement avec CSB (39). Enfin, les aa 981 à 1009 forment le domaine PIP, requis pour l'interaction avec le PCNA. L'arginine en position 992 est d'ailleurs indispensable pour cette interaction (313).

### V.I. XPG dans la réparation par excision de nucléotides

XPG joue un rôle double dans le NER : elle est une protéine structurelle, mais également active. Elle est recrutée au site de la lésion par TFIIH, XPA et RPA, où elle va former un complexe de pré-incision qui procède à la vérification du dommage. Dans ce complexe, XPG n'a pas d'activité catalytique, mais sa présence est indispensable au recrutement de la protéine XPF, son pendant en 5' (314). Une fois que la protéine XPF a procédé à l'incision en 5' de la lésion, une extrémité 3'-OH libre est générée, et la machinerie de synthèse de l'ADN, à savoir la polymérase  $\delta$ , le chargeur de pince RFC et le facteur de processivité PCNA, peut y être recrutée pour procéder à la synthèse de la séquence remplissant la lacune (315). L'incision en 3' par XPG pourrait intervenir après un blocage de la Polymérase au milieu de la synthèse, et la synthèse s'achèverait suite à cette incision, avant l'étape de ligation (315).



**Figure 10 :** *La structure de la protéine XPG.*

Les régions responsables de ses principales interactions sont indiquées avec une ligne horizontale surmontée de la protéine ou du complexe protéique concerné par l'interaction. N et I : Domaines catalytiques. UBM : Motif de liaison à l'ubiquitine. PIP : Peptide d'interaction avec PCNA.

## V.II. XPG et l'activité transcriptionnelle

En plus de son rôle dans le NER, XPG joue également de multiples rôles dans l'activité transcriptionnelle de la cellule. Elle interagit avec l'ARN Polymérase 2 en cours d'élongation (316). De manière intéressante, elle interagit plus étroitement avec les bulles d'ADN de transcription, qui mesurent entre 14 et 22 nucléotides, qu'avec les bulles d'ADN du NER, qui mesurent 30 nucléotides. XPG permet de stabiliser l'interaction CSB-ARN Pol 2. Le complexe TFIIH, composant obligatoire du complexe d'initiation de la transcription par l'ARN Polymérase 2 (312) est également lié au complexe XPG,CSB et ARN Pol 2. TFIIH pourrait être impliqué dans le remodelage de la bulle transcriptionnelle quand l'ARN Pol 2 est bloquée par une lésion, ce qui pourrait permettre l'incision par XPG au cours de la réparation (316). Le complexe XPG-TFIIH est également nécessaire à la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité de la Pol 2, phosphorylation effectuée par Cdk7. Ceci renforce encore plus l'idée de la nécessité d'XPG pour la transcription par l'ARN Polymérase 2 (310). Globalement, XPG semble être un élément clé de la stabilité du complexe TFIIH, et plus particulièrement du lien entre le core et le CAK. La protéine XPG a également été localisée dans le nucléole, où a lieu la transcription des gènes ribosomiques (39).

## V.III. Les autres rôles de la protéine XPG

La protéine XPG est impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN, qui peuvent être causés par l'exposition à des radiations ionisantes ou à des composés radiomimétiques. XPG active hNTH1 (317,318), une glycosylase/apurinique/apyrimidique ADN. Cette protéine réalise l'excision initiale d'une base pyrimidique qui a subi des dommages oxydatifs. XPG permet de renforcer l'interaction entre hNTH1 et l'ADN, et il est important de noter que cette action est spécifique à XPG, qui ne peut être remplacée par un autre membre de la famille FEN-1 (317). Curieusement, l'activité catalytique d'XPG n'est pas nécessaire pour son rôle dans le BER : en effet, une protéine XPG mutée sur l'acide aminé 791 ou 792, deux acides aminés indispensables pour l'activité catalytique de la protéine, joue tout de même son rôle dans le BER. De fait, des patients avec un simple Xeroderma Pigmentosum de type G n'ont pas de défaut de la réparation des dommages oxydatifs, tandis que des patients XP-G/CS, dont la protéine XPG est sévèrement tronquée, ne peuvent pas réparer correctement les dommages oxydatifs. Un lien entre le syndrome de Cockayne et les dommages oxydatifs pourrait donc être extrapolé (317).

La protéine XPG joue également un rôle dans la résolution des R-loops, des structures formées par l'hybridation d'un brin d'ARN néosynthétisé avec la double hélice située en amont d'une polymérase en cours de transcription. Les régions riches en G et C ou un superenroulement négatif consécutif à une forte activité transcriptionnelle favorisent l'apparition de ces structures néfastes pour le génome (319). En association avec d'autres protéines du NER, telles que XPB, XPD et XPF, la protéine XPG conduit à la formation d'une cassure double brin, soit en incisant un brin, qui amènera à une cassure double brin à travers la répllication de l'ADN, soit en clivant les deux brins, en association avec XPF (320). Cette cassure double brin sera ensuite réparée par le biais des systèmes de réparation classiques de la cellule. Récemment, il a été montré que la protéine XPG est recrutée par Rad52 et BRCA1, deux protéines impliquées dans la réparation par recombinaison homologue. Ces deux protéines recrutent l'endonucléase 3' dans les régions transcriptionnellement actives où l'ARN Polymérase 2 est bloquée par des cassures double brins, conduisant à la formation de R-loops avec l'ARNm néosynthétisé (250), laissé nu derrière l'ARN Polymérase 2. XPG incise

en 3' du R-loop, ce qui amène au recrutement de RPA et Rad51 et à l'initiation d'un mécanisme appelé Réparation par recombinaison homologue associée à la transcription (TA-HRR). Ce mécanisme contribue à une réparation fidèle de ces régions activement transcrites et contribue à la conservation de l'intégrité du génome. Jusqu'à 5 % des cassures double brins induites par les radiations ionisantes pourraient être réparées par ce mécanisme de TA-HRR (250).

Afin que la transcription puisse se dérouler correctement, il est capital que l'ADN soit exempt de tout dommages. Fort heureusement, les systèmes de réparation à la disposition de notre cellule permettent un maintien de l'intégrité du génome et un développement correct du vivant. Toutefois, en cas de mutation de certains gènes codant pour des protéines de la réparation, on assiste à l'apparition de syndromes multifactoriels. C'est le cas de la combinaison mortelle entre le *Xeroderma Pigmentosum* de type G et le syndrome de Cockayne. Les symptômes ne peuvent pas être causés uniquement par un défaut de la réparation par le NER. La localisation nucléolaire de la protéine XPG et ses multiples rôles dans de nombreux processus cellulaires nous ont amené à nous demander si la protéine XPG pouvait avoir un rôle dans la transcription des gènes ribosomiques et dans la maturation des ARN ribosomiques. En effet, la perturbation de l'homéostasie ribosomique provoque une catégorie de maladies nommées ribosomopathies, qui par certains aspects peuvent être rapprochées de la combinaison XP/CS. De plus, par effet de cascade, de nombreux processus en aval de la synthèse ribosomique seront affectés par la perturbation de l'homéostasie ribosomique. Les objectifs de cette thèse sont donc multiples :

- Analyser la biogenèse des ribosomes en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle, dans le contexte du syndrome XP-G/CS.
- Tenter de comprendre les mécanismes de régulation de la protéine XPG et savoir s'ils interviennent co-transcriptionnellement ou post-transcriptionnellement.
- Poser les bases de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients atteints de ce syndrome.

## BIBLIOGRAPHIE :

1. Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* nov 1999;24(11):437-40.
2. Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 1 janv 2007;64(1):29-49.
3. Grummt I, Längst G. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 1 mars 2013;1829(3):393-404.
4. Boukhgalter B, Liu M, Guo A, Tripp M, Tran K, Huynh C, et al. Characterization of a fission yeast subunit of an RNA polymerase I essential transcription initiation factor, SpRrn7h/TAF(I)68, that bridges yeast and mammals: association with SpRrn11h and the core ribosomal RNA gene promoter. *Gene.* 29 mai 2002;291(1-2):187-201.
5. McNamar R, Rothblum K, Rothblum LI. The Mammalian and Yeast A49 and A34 Heterodimers: Homologous but Not the Same. 2021;15.
6. Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, et al. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol.* 29 déc 2008;183(7):1259-74.
7. O'Mahony DJ, Rothblum LI. Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 avr 1991;88(8):3180-4.
8. Hannan RD, Stefanovsky V, Taylor L, Moss T, Rothblum LI. Overexpression of the transcription factor UBF1 is sufficient to increase ribosomal DNA transcription in neonatal cardiomyocytes: implications for cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 août 1996;93(16):8750-5.
9. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell.* 3 mars 2006;21(5):629-39.
10. Jantzen HM, Chow AM, King DS, Tjian R. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev.* oct 1992;6(10):1950-63.
11. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JCBM. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 26 juill 2006;25(14):3310-22.
12. Moss T, Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T. A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. *Biochem Soc Trans.* déc 2006;34(Pt 6):1079-81.

13. O'Sullivan AC, Sullivan GJ, McStay B. UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol.* janv 2002;22(2):657-68.
14. Mais C, Wright JE, Prieto J-L, Raggett SL, McStay B. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev.* 1 janv 2005;19(1):50-64.
15. Herdman C, Mars J-C, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Sabourin-Felix M, Lindsay H, et al. A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS Genet.* juill 2017;13(7):e1006899.
16. Mars J-C, Sabourin-Felix M, Tremblay MG, Moss T. A Deconvolution Protocol for ChIP-Seq Reveals Analogous Enhancer Structures on the Mouse and Human Ribosomal RNA Genes. *G3 (Bethesda).* 4 janv 2018;8(1):303-14.
17. Miller G, Panov KI, Friedrich JK, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Zomerdijk JC. hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO J.* 15 mars 2001;20(6):1373-82.
18. Yuan X, Zhao J, Zentgraf H, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep.* nov 2002;3(11):1082-7.
19. Engel C, Gubbey T, Neyer S, Sainsbury S, Oberthuer C, Baejen C, et al. Structural Basis of RNA Polymerase I Transcription Initiation. *Cell.* 23 mars 2017;169(1):120-131.e22.
20. Längst G, Blank TA, Becker PB, Grummt I. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J.* 17 févr 1997;16(4):760-8.
21. Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Längst G, et al. NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO Journal.* 3 sept 2001;20(17):4892-900.
22. Zhou Y, Santoro R, Grummt I. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *The EMBO Journal.* 2 sept 2002;21(17):4632-40.
23. Santoro R, Li J, Grummt I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet.* nov 2002;32(3):393-6.
24. Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y. Activation of RNA Polymerase I Transcription by Cockayne Syndrome Group B Protein and Histone Methyltransferase G9a. *Molecular Cell.* 17 août 2007;27(4):585-95.

25. Panov KI, Friedrich JK, Zomerdijk JC. A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* avr 2001;21(8):2641-9.
26. Bierhoff H, Dundr M, Michels AA, Grummt I. Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Mol Cell Biol.* août 2008;28(16):4988-98.
27. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JCBM. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 26 juill 2006;25(14):3310-22.
28. Panov KI, Panova TB, Gadal O, Nishiyama K, Saito T, Russell J, et al. RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol.* juill 2006;26(14):5436-48.
29. Dundr M. A Kinetic Framework for a Mammalian RNA Polymerase in Vivo. *Science.* 22 nov 2002;298(5598):1623-6.
30. Denissov S, Lessard F, Mayer C, Stefanovsky V, van Driel M, Grummt I, et al. A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO Rep.* mars 2011;12(3):231-7.
31. Rickards B, Flint SJ, Cole MD, LeRoy G. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol.* févr 2007;27(3):937-48.
32. Murano K, Okuwaki M, Hisaoka M, Nagata K. Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol.* mai 2008;28(10):3114-26.
33. Birch JL, Tan BC-M, Panov KI, Panova TB, Andersen JS, Owen-Hughes TA, et al. FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. *EMBO J.* 8 avr 2009;28(7):854-65.
34. Percipalle P, Fomproix N, Cavellán E, Voit R, Reimer G, Krüger T, et al. The chromatin remodelling complex WSTF–SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO reports.* 1 mai 2006;7(5):525-30.
35. Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I. Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes & Development.* 1 févr 2008;22(3):322-30.
36. Cerutti E, Daniel L, Donnio L-M, Neuillet D, Magnani C, Mari P-O, et al.  $\beta$ -Actin and Nuclear Myosin I are responsible for nucleolar reorganization during DNA Repair [Internet]. 2019 mai [cité 3 sept 2021] p. 646471. Disponible à : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/646471v1>
37. Rose KM, Szopa J, Han FS, Cheng YC, Richter A, Scheer U. Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription. *Chromosoma.* 1988;96(6):411-6.
38. Nonnekens J, Perez-Fernandez J, Theil AF, Gadal O, Bonnart C, Giglia-Mari G. Mutations in TFIIF causing trichothiodystrophy are responsible for defects in

- ribosomal RNA production and processing. *Human Molecular Genetics*. 15 juill 2013;22(14):2881-93.
39. Bradsher J, Auriol J, Santis LP de, Iben S, Vonesch J-L, Grummt I, et al. CSB Is a Component of RNA Pol I Transcription. *Molecular Cell*. 1 oct 2002;10(4):819-29.
  40. Shiratori M, Suzuki T, Itoh C, Goto M, Furuichi Y, Matsumoto T. WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA as a component of an RNA polymerase I-associated complex. *Oncogene*. 11 avr 2002;21(16):2447-54.
  41. Schmitz K-M, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, Schäfer A, Grummt I, Mayer C. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell*. 13 févr 2009;33(3):344-53.
  42. Schneider DA, Michel A, Sikes ML, Vu L, Dodd JA, Salgia S, et al. Transcription Elongation by RNA Polymerase I Is Linked to Efficient rRNA Processing and Ribosome Assembly. *Mol Cell*. 27 avr 2007;26(2):217-29.
  43. Schneider DA, French SL, Osheim YN, Bailey AO, Vu L, Dodd J, et al. RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 août 2006;103(34):12707-12.
  44. Jansa P, Mason SW, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J*. 15 mai 1998;17(10):2855-64.
  45. Bartsch I, Schoneberg C, Grummt I. Purification and characterization of TTFI, a factor that mediates termination of mouse ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol*. sept 1988;8(9):3891-7.
  46. La Volpe A, Simeone A, D'Esposito M, Scotto L, Fidanza V, de Falco A, et al. Molecular analysis of the heterogeneity region of the human ribosomal spacer. *J Mol Biol*. 25 mai 1985;183(2):213-23.
  47. El Hage A, Koper M, Kufel J, Tollervey D. Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev*. 15 avr 2008;22(8):1069-81.
  48. Braglia P, Heindl K, Schleiffer A, Martinez J, Proudfoot NJ. Role of the RNA/DNA kinase Grc3 in transcription termination by RNA polymerase I. *EMBO Rep*. oct 2010;11(10):758-64.
  49. Prescott EM, Osheim YN, Jones HS, Alen CM, Roan JG, Reeder RH, et al. Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *PNAS*. 20 avr 2004;101(16):6068-73.
  50. Németh A, Guibert S, Tiwari VK, Ohlsson R, Längst G. Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *EMBO J*. 23 avr 2008;27(8):1255-65.

51. Lin C-Y, Navarro S, Reddy S, Comai L. CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(17):4752-66.
52. Fath S, Kobor MS, Philippi A, Greenblatt J, Tschochner H. Dephosphorylation of RNA polymerase I by Fcp1p is required for efficient rRNA synthesis. *J Biol Chem.* 11 juin 2004;279(24):25251-9.
53. Russell J, Zomerdijk JCBM. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci.* févr 2005;30(2):87-96.
54. Conaway RC, Conaway JW. General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1997;56:327-46.
55. Kornberg RD. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 7 août 2007;104(32):12955-61.
56. Ponjavic J, Lenhard B, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, et al. Transcriptional and structural impact of TATA-initiation site spacing in mammalian core promoters. *Genome Biol.* 2006;7(8):R78.
57. Cianfrocco MA, Kassavetis GA, Grob P, Fang J, Juven-Gershon T, Kadonaga JT, et al. Human TFIID binds to core promoter DNA in a reorganized structural state. *Cell.* 17 janv 2013;152(1-2):120-31.
58. Hieb AR, Halsey WA, Betterton MD, Perkins TT, Kugel JF, Goodrich JA. TFIIA changes the conformation of the DNA in TBP/TATA complexes and increases their kinetic stability. *J Mol Biol.* 21 sept 2007;372(3):619-32.
59. Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature.* 7 oct 1993;365(6446):520-7.
60. Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2015;16(3):129-43.
61. Čabart P, Újvári A, Pal M, Luse DS. Transcription factor TFIIIF is not required for initiation by RNA polymerase II, but it is essential to stabilize transcription factor TFIIIB in early elongation complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 sept 2011;108(38):15786-91.
62. Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell.* janv 1999;3(1):87-95.
63. Nozawa K, Schneider TR, Cramer P. Core Mediator structure at 3.4 Å extends model of transcription initiation complex. *Nature.* 11 2017;545(7653):248-51.
64. Cevher MA, Shi Y, Li D, Chait BT, Malik S, Roeder RG. Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a critical role of the MED14 subunit. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2014;21(12):1028-34.

65. Jeronimo C, Langelier M-F, Bataille AR, Pascal JM, Pugh BF, Robert F. Tail and Kinase Modules Differently Regulate Core Mediator Recruitment and Function In Vivo. *Mol Cell*. 03 2016;64(3):455-66.
66. Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. déc 2013;48(6):575-608.
67. Soutourina J, Wydau S, Ambroise Y, Boschiero C, Werner M. Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science*. 18 mars 2011;331(6023):1451-4.
68. Cai G, Imasaki T, Yamada K, Cardelli F, Takagi Y, Asturias FJ. Mediator head module structure and functional interactions. *Nat Struct Mol Biol*. mars 2010;17(3):273-9.
69. Esnault C, Ghavi-Helm Y, Brun S, Soutourina J, Van Berkum N, Boschiero C, et al. Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol Cell*. 8 août 2008;31(3):337-46.
70. Ansari SA, Paul E, Sommer S, Lieleg C, He Q, Daly AZ, et al. Mediator, TATA-binding protein, and RNA polymerase II contribute to low histone occupancy at active gene promoters in yeast. *J Biol Chem*. 23 mai 2014;289(21):14981-95.
71. Zhu X, Zhang Y, Bjornsdottir G, Liu Z, Quan A, Costanzo M, et al. Histone modifications influence mediator interactions with chromatin. *Nucleic Acids Res*. oct 2011;39(19):8342-54.
72. Wade JT, Struhl K. The transition from transcriptional initiation to elongation. *Curr Opin Genet Dev*. avr 2008;18(2):130-6.
73. Feaver WJ, Svejstrup JQ, Henry NL, Kornberg RD. Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIID/TFIIDK. *Cell*. 16 déc 1994;79(6):1103-9.
74. Nechaev S, Adelman K. Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. janv 2011;1809(1):34-45.
75. Wong KH, Jin Y, Struhl K. TFIID phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Mol Cell*. 22 mai 2014;54(4):601-12.
76. Skene PJ, Hernandez AE, Groudine M, Henikoff S. The nucleosomal barrier to promoter escape by RNA polymerase II is overcome by the chromatin remodeler Chd1. Espinosa JM, éditeur. *eLife*. 15 avr 2014;3:e02042.
77. Core L, Adelman K. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev*. 01 2019;33(15-16):960-82.
78. Fant CB, Levandowski CB, Gupta K, Maas ZL, Moir J, Rubin JD, et al. TFIID Enables RNA Polymerase II Promoter-Proximal Pausing. *Mol Cell*. 17 mars 2020;

79. Missra A, Gilmour DS. Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 juin 2010;107(25):11301-6.
80. Vos SM, Farnung L, Urlaub H, Cramer P. Structure of paused transcription complex Pol II-DSIF-NELF. *Nature*. août 2018;560(7720):601-6.
81. Gilchrist DA, Santos GD, Fargo DC, Xie B, Gao Y, Li L, et al. Pausing of RNA polymerase II Disrupts DNA-specified Nucleosome Organization to Enable Precise Gene Regulation. *Cell*. 12 nov 2010;143(4):540-51.
82. Shao W, Zeitlinger J. Paused RNA polymerase II inhibits new transcriptional initiation. *Nat Genet*. juill 2017;49(7):1045-51.
83. Adelman K, Lis JT. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet*. oct 2012;13(10):720-31.
84. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 13 juill 2007;130(1):77-88.
85. Takahashi H, Parmely TJ, Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CAS, Kong SE, et al. Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell*. 8 juill 2011;146(1):92-104.
86. Wu S-Y, Chiang C-M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 4 mai 2007;282(18):13141-5.
87. Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ, et al. Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*. nov 2012;19(11):1108-15.
88. Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell*. 20 janv 2006;21(2):227-37.
89. Czudnochowski N, Bösken CA, Geyer M. Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nat Commun*. 15 mai 2012;3:842.
90. Bartkowiak B, Liu P, Phatnani HP, Fuda NJ, Cooper JJ, Price DH, et al. CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev*. 15 oct 2010;24(20):2303-16.
91. Liu X, Bushnell DA, Kornberg RD. RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochim Biophys Acta*. janv 2013;1829(1):2-8.
92. Schier AC, Taatjes DJ. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev*. 1 avr 2020;34(7-8):465-88.

93. Kemble DJ, McCullough LL, Whitby FG, Formosa T, Hill CP. FACT Disrupts Nucleosome Structure by Binding H2A-H2B with Conserved Peptide Motifs. *Mol Cell*. 15 oct 2015;60(2):294-306.
94. Chen FX, Smith ER, Shilatifard A. Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2018;19(7):464-78.
95. Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, et al. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell*. mars 2003;11(3):721-9.
96. Proudfoot NJ. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev*. 9 janv 2011;25(17):1770-82.
97. Chan SL, Huppertz I, Yao C, Weng L, Moresco JJ, Yates JR, et al. CPSF30 and Wdr33 directly bind to AAUAAA in mammalian mRNA 3' processing. *Genes Dev*. 1 nov 2014;28(21):2370-80.
98. Mandel CR, Kaneko S, Zhang H, Gebauer D, Vethantham V, Manley JL, et al. Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature*. 14 déc 2006;444(7121):953-6.
99. Whitelaw E, Proudfoot N. Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. *EMBO J*. nov 1986;5(11):2915-22.
100. Gregersen LH, Mitter R, Ugalde AP, Nojima T, Proudfoot NJ, Agami R, et al. SCAF4 and SCAF8, mRNA Anti-Terminator Proteins. *Cell*. 13 juin 2019;177(7):1797-1813.e18.
101. Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*. 2 déc 2010;468(7324):664-8.
102. Dubbury SJ, Boutz PL, Sharp PA. CDK12 regulates DNA repair genes by suppressing intronic polyadenylation. *Nature*. déc 2018;564(7734):141-5.
103. Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haften G, Kühn U, Menzies FM, et al. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell*. 27 avr 2012;149(3):538-53.
104. Zhang H, Rigo F, Martinson HG. Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site. *Mol Cell*. 6 août 2015;59(3):437-48.
105. Osheim YN, Sikes ML, Beyer AL. EM visualization of Pol II genes in *Drosophila*: most genes terminate without prior 3' end cleavage of nascent transcripts. *Chromosoma*. 1 mars 2002;111(1):1-12.
106. Custódio N, Carmo-Fonseca M, Geraghty F, Pereira HS, Grosveld F, Antoniou M. Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *EMBO J*. 17 mai 1999;18(10):2855-66.

107. West S, Gromak N, Proudfoot NJ. Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature*. nov 2004;432(7016):522-5.
108. Eaton JD, Davidson L, Bauer DLV, Natsume T, Kanemaki MT, West S. Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity. *Genes Dev*. 15 janv 2018;32(2):127-39.
109. Parua PK, Booth GT, Sansó M, Benjamin B, Tanny JC, Lis JT, et al. A Cdk9–PP1 switch regulates the elongation–termination transition of RNA polymerase II. *Nature*. juin 2018;558(7710):460-4.
110. Shi Y, Di Giammartino DC, Taylor D, Sarkeshik A, Rice WJ, Yates JR, et al. Molecular Architecture of the Human Pre-mRNA 3' Processing Complex. *Molecular Cell*. 13 févr 2009;33(3):365-76.
111. Schrieck A, Easter AD, Etzold S, Wiederhold K, Lidschreiber M, Cramer P, et al. RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nat Struct Mol Biol*. févr 2014;21(2):175-9.
112. Shah N, Maqbool MA, Yahia Y, El Aabidine AZ, Esnault C, Forné I, et al. Tyrosine-1 of RNA Polymerase II CTD Controls Global Termination of Gene Transcription in Mammals. *Molecular Cell*. 4 janv 2018;69(1):48-61.e6.
113. Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL. The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev*. 15 juill 2007;21(14):1779-89.
114. Crossley MP, Bocek M, Cimprich KA. R-Loops as Cellular Regulators and Genomic Threats. *Molecular Cell*. 7 févr 2019;73(3):398-411.
115. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ, Gromak N. Human Senataxin Resolves RNA/DNA Hybrids Formed at Transcriptional Pause Sites to Promote Xrn2-Dependent Termination. *Molecular Cell*. 24 juin 2011;42(6):794-805.
116. Cortazar MA, Sheridan RM, Erickson B, Fong N, Glover-Cutter K, Brannan K, et al. Control of RNA Pol II Speed by PNUITS-PP1 and Spt5 Dephosphorylation Facilitates Termination by a « Sitting Duck Torpedo » Mechanism. *Mol Cell*. 19 2019;76(6):896-908.e4.
117. Hoek TA, Khuperkar D, Lindeboom RGH, Sonneveld S, Verhagen BMP, Boersma S, et al. Single-Molecule Imaging Uncovers Rules Governing Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Molecular Cell*. 25 juill 2019;75(2):324-339.e11.
118. Sun Y, McCorvie TJ, Yates LA, Zhang X. Structural basis of homologous recombination. *Cell Mol Life Sci*. janv 2020;77(1):3-18.
119. Fong N, Brannan K, Erickson B, Kim H, Cortazar MA, Sheridan RM, et al. Effects of Transcription Elongation Rate and Xrn2 Exonuclease Activity on RNA Polymerase II

- Termination Suggest Widespread Kinetic Competition. *Molecular Cell*. 15 oct 2015;60(2):256-67.
120. Richards J, Belasco JG. Ribonuclease J: How to Lead a Double Life. *Structure*. 7 sept 2011;19(9):1201-3.
  121. Sanders TJ, Wenck BR, Selan JN, Barker MP, Trimmer SA, Walker JE, et al. FttA is a CPSF73 homologue that terminates transcription in Archaea. *Nat Microbiol*. avr 2020;5(4):545-53.
  122. Baillat D, Hakimi M-A, Näär AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R. Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell*. 21 oct 2005;123(2):265-76.
  123. O'Reilly D, Kuznetsova OV, Laitem C, Zaborowska J, Dienstbier M, Murphy S. Human snRNA genes use polyadenylation factors to promote efficient transcription termination. *Nucleic Acids Research*. 1 janv 2014;42(1):264-75.
  124. Tatomer DC, Elrod ND, Liang D, Xiao M-S, Jiang JZ, Jonathan M, et al. The Integrator complex cleaves nascent mRNAs to attenuate transcription. *Genes Dev*. 11 janv 2019;33(21-22):1525-38.
  125. Szczepińska T, Kalisiak K, Tomecki R, Labno A, Borowski LS, Kulinski TM, et al. DIS3 shapes the RNA polymerase II transcriptome in humans by degrading a variety of unwanted transcripts. *Genome Res*. 11 janv 2015;25(11):1622-33.
  126. Zhang Z, Gilmour DS. Pcf11 Is a Termination Factor in *Drosophila* that Dismantles the Elongation Complex by Bridging the CTD of RNA Polymerase II to the Nascent Transcript. *Molecular Cell*. 6 janv 2006;21(1):65-74.
  127. Krebs AR, Imanci D, Hoerner L, Gaidatzis D, Burger L, Schübeler D. Genome-wide Single-Molecule Footprinting Reveals High RNA Polymerase II Turnover at Paused Promoters. *Molecular Cell*. 3 août 2017;67(3):411-422.e4.
  128. Erickson B, Sheridan RM, Cortazar M, Bentley DL. Dynamic turnover of paused Pol II complexes at human promoters. *Genes Dev*. 01 2018;32(17-18):1215-25.
  129. Elrod ND, Henriques T, Huang K-L, Tatomer DC, Wilusz JE, Wagner EJ, et al. The Integrator Complex Attenuates Promoter-Proximal Transcription at Protein-Coding Genes. *Molecular Cell*. 5 déc 2019;76(5):738-752.e7.
  130. Lai F, Gardini A, Zhang A, Shiekhattar R. Integrator mediates the biogenesis of enhancer RNAs. *Nature*. sept 2015;525(7569):399-403.
  131. Nojima T, Tellier M, Foxwell J, Ribeiro de Almeida C, Tan-Wong SM, Dhir S, et al. Dereglated Expression of Mammalian lncRNA through Loss of SPT6 Induces R-Loop Formation, Replication Stress, and Cellular Senescence. *Molecular Cell*. 20 déc 2018;72(6):970-984.e7.

132. Nojima T, Gomes T, Grosso ARF, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, et al. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell*. 23 avr 2015;161(3):526-40.
133. Ntini E, Järvelin AI, Bornholdt J, Chen Y, Boyd M, Jørgensen M, et al. Polyadenylation site-induced decay of upstream transcripts enforces promoter directionality. *Nat Struct Mol Biol*. août 2013;20(8):923-8.
134. Almada AE, Wu X, Kriz AJ, Burge CB, Sharp PA. Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals. *Nature*. juill 2013;499(7458):360-3.
135. Dieci G, Conti A, Pagano A, Carnevali D. Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochim Biophys Acta*. avr 2013;1829(3-4):296-305.
136. Fedoriw AM, Starmer J, Yee D, Magnuson T. Nucleolar association and transcriptional inhibition through 5S rDNA in mammals. *PLoS Genet*. janv 2012;8(1):e1002468.
137. Acker J, Conesa C, Lefebvre O. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim Biophys Acta*. avr 2013;1829(3-4):283-95.
138. Camier S, Dechampsme AM, Sentenac A. The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 sept 1995;92(20):9338-42.
139. Margottin F, Dujardin G, Gérard M, Egly JM, Huet J, Sentenac A. Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase C. *Science*. 25 janv 1991;251(4992):424-6.
140. Baker RE, Camier S, Sentenac A, Hall BD. Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor tau to two intragenic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1987;84(24):8768-72.
141. Deprez E, Arrebola R, Conesa C, Sentenac A. A subunit of yeast TFIIIC participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. déc 1999;19(12):8042-51.
142. Jordán-Pla A, Gupta I, de Miguel-Jiménez L, Steinmetz LM, Chávez S, Pelechano V, et al. Chromatin-dependent regulation of RNA polymerases II and III activity throughout the transcription cycle. *Nucleic Acids Research*. 30 janv 2015;43(2):787-802.
143. Turowski TW, Leśniewska E, Delan-Forino C, Sayou C, Boguta M, Tollervey D. Global analysis of transcriptionally engaged yeast RNA polymerase III reveals extended tRNA transcripts. *Genome Res*. juill 2016;26(7):933-44.
144. Soragni E, Kassavetis GA. Absolute gene occupancies by RNA polymerase III, TFIIIB, and TFIIIC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 26 sept 2008;283(39):26568-76.
145. Ruet A, Camier S, Smagowicz W, Sentenac A, Fromageot P. Isolation of a class C transcription factor which forms a stable complex with tRNA genes. *EMBO J*. févr 1984;3(2):343-50.

146. Turowski TW, Tollervey D. Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans.* 15 oct 2016;44(5):1367-75.
147. Arimbasseri AG, Rijal K, Maraia RJ. Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochim Biophys Acta.* avr 2013;1829(3-4):318-30.
148. Arimbasseri AG, Maraia RJ. Biochemical analysis of transcription termination by RNA polymerase III from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2015;1276:185-98.
149. Canella D, Praz V, Reina JH, Cousin P, Hernandez N. Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res.* juin 2010;20(6):710-21.
150. Orioli A, Pascali C, Quartararo J, Diebel KW, Praz V, Romascano D, et al. Widespread occurrence of non-canonical transcription termination by human RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* juill 2011;39(13):5499-512.
151. Carlsten JOP, Zhu X, López MD, Samuelsson T, Gustafsson CM. Loss of the Mediator subunit Med20 affects transcription of tRNA and other non-coding RNA genes in fission yeast. *Biochim Biophys Acta.* févr 2016;1859(2):339-47.
152. Reuter LM, Meinel DM, Sträßer K. The poly(A)-binding protein Nab2 functions in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 15 juill 2015;29(14):1565-75.
153. Schmid M, Poulsen MB, Olszewski P, Pelechano V, Saguez C, Gupta I, et al. Rrp6p controls mRNA poly(A) tail length and its decoration with poly(A) binding proteins. *Mol Cell.* 27 juill 2012;47(2):267-80.
154. Dieci G, Sentenac A. Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell.* 26 janv 1996;84(2):245-52.
155. Deshmukh M, Stark J, Yeh LC, Lee JC, Woolford JL. Multiple regions of yeast ribosomal protein L1 are important for its interaction with 5 S rRNA and assembly into ribosomes. *J Biol Chem.* 15 déc 1995;270(50):30148-56.
156. Warner JR, Soeiro R. Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1967;58(5):1984-90.
157. Zhang J, Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, Tang L, Guo Y, Oeffinger M, et al. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev.* 15 oct 2007;21(20):2580-92.
158. Steitz JA, Berg C, Hendrick JP, La Branche-Chabot H, Metspalu A, Rinke J, et al. A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol.* mars 1988;106(3):545-56.
159. Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:375-403.

160. Maraia RJ, Intine RV. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol.* janv 2001;21(2):367-79.
161. Yoo CJ, Wolin SL. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol Cell Biol.* août 1994;14(8):5412-24.
162. Yoo CJ, Wolin SL. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell.* 2 mai 1997;89(3):393-402.
163. Lee Y, Nazar RN. Ribosomal 5 S rRNA maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 13 juin 1997;272(24):15206-12.
164. Deshmukh M, Tsay YF, Paulovich AG, Woolford JL. Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol.* mai 1993;13(5):2835-45.
165. Rosorius O, Fries B, Stauber RH, Hirschmann N, Bevec D, Hauber J. Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J Biol Chem.* 21 avr 2000;275(16):12061-8.
166. van Hoof A, Lennertz P, Parker R. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* 15 mars 2000;19(6):1357-65.
167. O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev.* 1 déc 1994;8(23):2891-903.
168. Kuai L, Fang F, Butler JS, Sherman F. Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 juin 2004;101(23):8581-6.
169. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem.* 20 juin 2019;88:281-306.
170. Cerqueira AV, Lemos B. Ribosomal DNA and the Nucleolus as Keystones of Nuclear Architecture, Organization, and Function. *Trends Genet.* oct 2019;35(10):710-23.
171. Lindström MS, Jurada D, Bursac S, Orsolich I, Bartek J, Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene.* mai 2018;37(18):2351-66.
172. Yu S, Lemos B. The long-range interaction map of ribosomal DNA arrays. *PLOS Genetics.* 23 mars 2018;14(3):e1007258.
173. He J-S, Soo P, Evers M, Parsons K, Hein N, Hannan K, et al. High-Content Imaging Approaches to Quantitate Stress-Induced Changes in Nucleolar Morphology. *Assay and drug development technologies.* 1 août 2018;16:320-32.
174. Wachtler F, Schöfer C, Mosgöller W, Weipoltshammer K, Schwarzacher HG, Guichaoua M, et al. Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar

- component of nucleoli: Light and electron microscopic in situ hybridization in human Sertoli cells. *Experimental Cell Research*. 1 janv 1992;198(1):135-43.
175. Leitch AR, Mosgoller W, Shi M, Heslop-Harrison JS. Different patterns of rDNA organization at interphase in nuclei of wheat and rye. *Journal of Cell Science*. 1 avr 1992;101(4):751-7.
  176. Raška I. Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1995;59(1):11-26.
  177. Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mars 1984;81(5):1431-5.
  178. Sobol M, Yildirim S, Philimonenko VV, Marášek P, Castaño E, Hozák P. UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus*. 1 nov 2013;4(6):478-86.
  179. Andersen JS, Lam YW, Leung AKL, Ong S-E, Lyon CE, Lamond AI, et al. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. janv 2005;433(7021):77-83.
  180. Farley KI, Surovtseva Y, Merkel J, Baserga SJ. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma*. 1 sept 2015;124(3):323-31.
  181. Dousset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D, Huang S. Initiation of Nucleolar Assembly Is Independent of RNA Polymerase I Transcription. *MBoC*. 1 août 2000;11(8):2705-17.
  182. Németh A, Grummt I. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr Opin Cell Biol*. 9 mars 2018;52:105-11.
  183. Kruhlak M, Crouch EE, Orlov M, Montañó C, Gorski SA, Nussenzweig A, et al. The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature*. juin 2007;447(7145):730-4.
  184. Harding SM, Boiarsky JA, Greenberg RA. ATM Dependent Silencing Links Nucleolar Chromatin Reorganization to DNA Damage Recognition. *Cell Reports*. 13 oct 2015;13(2):251-9.
  185. van Sluis M, McStay B. Nucleolar reorganization in response to rDNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. juin 2017;46:81-6.
  186. Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell*. mai 2005;16(5):2395-413.
  187. Warmerdam DO, van den Berg J, Medema RH. Breaks in the 45S rDNA Lead to Recombination-Mediated Loss of Repeats. *Cell Reports*. 22 mars 2016;14(11):2519-27.

188. Daniel L, Cerutti E, Donnio L-M, Nonnekens J, Carrat C, Zahova S, et al. Mechanistic insights in transcription-coupled nucleotide excision repair of ribosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 2018;115(29):E6770-9.
189. Scherrer K, Latham H, Darnell JE. DEMONSTRATION OF AN UNSTABLE RNA AND OF A PRECURSOR TO RIBOSOMAL RNA IN HELA CELLS. *PNAS*. 1 févr 1963;49(2):240-8.
190. Miller OL, Beatty BR. Visualization of nucleolar genes. *Science*. 23 mai 1969;164(3882):955-7.
191. Udem SA, Warner JR. The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem*. 25 févr 1973;248(4):1412-6.
192. Trapman J, Retèl J, Planta RJ. Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res*. janv 1975;90(1):95-104.
193. Kressler Dieter, Linder Patrick, de la Cruz Jesús. Protein trans-Acting Factors Involved in Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1 déc 1999;19(12):7897-912.
194. Prestayko AW, Tonato M, Busch H. Low molecular weight RNA associated with 28 s nucleolar RNA. *J Mol Biol*. 14 févr 1970;47(3):505-15.
195. Watkins NJ, Ségault V, Charpentier B, Nottrott S, Fabrizio P, Bachi A, et al. A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*. 27 oct 2000;103(3):457-66.
196. Calvet JP, Pederson T. Base-pairing interactions between small nuclear RNAs and nuclear RNA precursors as revealed by psoralen cross-linking in vivo. *Cell*. nov 1981;26(3 Pt 1):363-70.
197. Tyc K, Steitz JA. A new interaction between the mouse 5' external transcribed spacer of pre-rRNA and U3 snRNA detected by psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Res*. 25 oct 1992;20(20):5375-82.
198. Jarmolowski A, Zagorski J, Li HV, Fournier MJ. Identification of essential elements in U14 RNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1 déc 1990;9(13):4503-9.
199. Bally M, Hughes J, Cesareni G. SnR30: a new, essential small nuclear RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 24 juin 1988;16(12):5291-303.
200. Balakin AG, Smith L, Fournier MJ. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*. 6 sept 1996;86(5):823-34.
201. Watkins NJ, Bohnsack MT. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. juin 2012;3(3):397-414.

202. Natchiar SK, Myasnikov AG, Kratzat H, Hazemann I, Klaholz BP. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature*. 23 nov 2017;551(7681):472-7.
203. Henras A, Plisson-Chastang C, O'Donohue M-F, Chakraborty A, Gleizes P-E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 1 oct 2014;6.
204. Badertscher L, Wild T, Montellese C, Alexander LT, Bammert L, Sarazova M, et al. Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells. *Cell Rep*. 29 déc 2015;13(12):2879-91.
205. Lazdins IB, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma*. juin 1997;105(7-8):481-95.
206. Carron C, O'Donohue M-F, Choesmel V, Faubladiet M, Gleizes P-E. Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals. *Nucleic Acids Res*. janv 2011;39(1):280-91.
207. Goldfarb KC, Cech TR. Targeted CRISPR disruption reveals a role for RNase MRP RNA in human preribosomal RNA processing. *Genes Dev*. 1 janv 2017;31(1):59-71.
208. Idol RA, Robledo S, Du H-Y, Crimmins DL, Wilson DB, Ladenson JH, et al. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells Mol Dis*. août 2007;39(1):35-43.
209. Tomecki R, Labno A, Drakowska K, Cysewski D, Dziembowski A. hUTP24 is essential for processing of the human rRNA precursor at site A1, but not at site A0. *RNA Biol*. 2015;12(9):1010-29.
210. Wells GR, Weichmann F, Colvin D, Sloan KE, Kudla G, Tollervey D, et al. The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res*. 20 juin 2016;44(11):5399-409.
211. Wells GR, Weichmann F, Sloan KE, Colvin D, Watkins NJ, Schneider C. The ribosome biogenesis factor  $\gamma$ Utp23/hUTP23 coordinates key interactions in the yeast and human pre-40S particle and hUTP23 contains an essential PIN domain. *Nucleic Acids Res*. 5 mai 2017;45(8):4796-809.
212. Preti M, O'Donohue M-F, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaillé M-L, Choesmel V, Gleizes P-E. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res*. avr 2013;41(8):4709-23.
213. Schilders G, van Dijk E, Pruijn GJM. C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Scf-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(8):2564-72.

214. Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJM, Watkins NJ. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol.* 4 mars 2013;200(5):577-88.
215. Gazda HT, Preti M, Sheen MR, O'Donohue M-F, Vlachos A, Davies SM, et al. Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat.* juill 2012;33(7):1037-44.
216. Yoshikawa H, Ishikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Hayano T, Isobe T, et al. Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 23 juin 2015;43(11):5524-36.
217. Rouquette J, Choesmel V, Gleizes P-E. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J.* 17 août 2005;24(16):2862-72.
218. Ishikawa H, Yoshikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Taoka M, Nobe Y, et al. Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic Acids Res.* 7 avr 2017;45(6):3437-47.
219. Henriksson N, Nilsson P, Wu M, Song H, Virtanen A. Recognition of adenosine residues by the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J Biol Chem.* 1 janv 2010;285(1):163-70.
220. Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, Stöhr N, Zirkel A, Dohm JC, et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA.* mai 2012;18(5):958-72.
221. Newie I, Søkilde R, Persson H, Jacomasso T, Gorbatenko A, Borg Å, et al. HER2-encoded mir-4728 forms a receptor-independent circuit with miR-21-5p through the non-canonical poly(A) polymerase PAPD5. *Sci Rep.* 18 oct 2016;6:35664.
222. Shukla S, Parker R. PARN Modulates Y RNA Stability and Its 3'-End Formation. *Mol Cell Biol.* 15 oct 2017;37(20):e00264-17.
223. Montellese C, Montel-Lehry N, Henras AK, Kutay U, Gleizes P-E, O'Donohue M-F. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res.* 20 juin 2017;45(11):6822-36.
224. Almeida CD, Scheer H, Zuber H, Gagliardi D. RNA uridylation: a key posttranscriptional modification shaping the coding and noncoding transcriptome. *WIREs RNA.* 2018;9(1):e1440.
225. Viegas SC, Silva IJ, Apura P, Matos RG, Arraiano CM. Surprises in the 3'-end: « U » can decide too! *FEBS J.* sept 2015;282(18):3489-99.

226. Bai D, Zhang J, Li T, Hang R, Liu Y, Tian Y, et al. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat Commun.* 1 août 2016;7(1):12310.
227. Schillewaert S, Wacheul L, Lhomme F, Lafontaine DLJ. The evolutionarily conserved protein Las1 is required for pre-rRNA processing at both ends of ITS2. *Mol Cell Biol.* janv 2012;32(2):430-44.
228. Wang M, Pestov DG. 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Res.* mars 2011;39(5):1811-22.
229. Michot B, Joseph N, Mazan S, Bachellerie JP. Evolutionarily conserved structural features in the ITS2 of mammalian pre-rRNAs and potential interactions with the snoRNA U8 detected by comparative analysis of new mouse sequences. *Nucleic Acids Res.* 1 juin 1999;27(11):2271-82.
230. Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries J-L, Mullineux S-T, Stamatopoulou V, Mullier R, et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell.* 22 août 2013;51(4):539-51.
231. Couté Y, Kindbeiter K, Belin S, Dieckmann R, Duret L, Bezin L, et al. ISG20L2, a novel vertebrate nucleolar exoribonuclease involved in ribosome biogenesis. *Mol Cell Proteomics.* mars 2008;7(3):546-59.
232. Ansel KM, Pastor WA, Rath N, Lapan AD, Glasmacher E, Wolf C, et al. Mouse Eri1 interacts with the ribosome and catalyzes 5.8S rRNA processing. *Nat Struct Mol Biol.* mai 2008;15(5):523-30.
233. Thomson E, Tollervey D. The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* févr 2010;30(4):976-84.
234. Trotta CR, Lund E, Kahan L, Johnson AW, Dahlberg JE. Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J.* 2 juin 2003;22(11):2841-51.
235. Faber AW, Vos HR, Vos JC, Raué HA. 5'-end formation of yeast 5.8S rRNA is an endonucleolytic event. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 juin 2006;345(2):796-802.
236. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 8 oct 2009;361(15):1475-85.
237. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 17 mai 2001;411(6835):366-74.
238. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 22 avr 1993;362(6422):709-15.
239. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2003;4(9):712-20.

240. Meek K, Dang V, Lees-Miller SP. DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol.* 2008;99:33-58.
241. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 22 mars 2002;108(6):781-94.
242. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell.* 27 janv 2006;124(2):301-13.
243. Ochi T, Blackford AN, Coates J, Jhujh S, Mehmood S, Tamura N, et al. DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science.* 9 janv 2015;347(6218):185-8.
244. Malu S, Malshetty V, Francis D, Cortes P. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res.* déc 2012;54(1-3):233-46.
245. Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2014;15(6):369-83.
246. Symington LS. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* juin 2016;51(3):195-212.
247. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer W-D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol.* oct 2010;17(10):1260-2.
248. Solinger JA, Kiiianitsa K, Heyer W-D. Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol Cell.* nov 2002;10(5):1175-88.
249. Heyer W-D, Li X, Rolfsmeier M, Zhang X-P. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* sept 2006;34(15):4115-25.
250. Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, Shiotani B, Yamauchi M, Nakada S, et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell.* 04 2018;175(2):558-570.e11.
251. Fishel R. Mismatch repair. *J Biol Chem.* 30 oct 2015;290(44):26395-403.
252. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res.* 2017;773:174-87.
253. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 avr 2013;5(4):a012583.
254. Wallace SS. Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst).* juill 2014;19:14-26.
255. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 23 janv 2003;421(6921):436-40.

256. Spivak G. Transcription-coupled repair: an update. *Arch Toxicol.* nov 2016;90(11):2583-94.
257. van Gool AJ, Citterio E, Rademakers S, van Os R, Vermeulen W, Constantinou A, et al. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J.* 1 oct 1997;16(19):5955-65.
258. van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly J-M, van Cappellen WA, et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *Journal of Cell Biology.* 28 juin 2004;166(1):27-36.
259. Saijo M. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mech Ageing Dev.* juin 2013;134(5-6):196-201.
260. Rimel JK, Taatjes DJ. The essential and multifunctional TFIIH complex. *Protein Sci.* 2018;27(6):1018-37.
261. Coin F, Oksenysh V, Egly J-M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell.* 27 avr 2007;26(2):245-56.
262. Compe E, Egly J-M. Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annu Rev Biochem.* 2 juin 2016;85:265-90.
263. Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M, Egly J-M. p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol Cell.* 20 janv 2006;21(2):215-26.
264. Sugitani N, Sivley RM, Perry KE, Capra JA, Chazin WJ. XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2016;44:123-35.
265. Li C-L, Golebiowski FM, Onishi Y, Samara NL, Sugasawa K, Yang W. Tripartite DNA Lesion Recognition and Verification by XPC, TFIIH, and XPA in Nucleotide Excision Repair. *Mol Cell.* 17 sept 2015;59(6):1025-34.
266. Coin F, Oksenysh V, Vincent M, Groh S, Blattner C, Egly J-M. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Molecular cell.* 1 août 2008;31:9-20.
267. Bhat KP, Cortez D. RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(6):446-53.
268. Kirschner K, Melton DW. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res.* sept 2010;30(9):3223-32.
269. Schärer OD. XPG: its products and biological roles. *Adv Exp Med Biol.* 2008;637:83-92.
270. Lehmann AR. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair (Amst).* 15 juill 2011;10(7):730-3.
271. Bukowska B, Karwowski BT. Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair. *Life Sci.* 15 févr 2018;195:6-18.

272. Spivak G. UV-sensitive syndrome. *Mutat Res.* 4 sept 2005;577(1-2):162-9.
273. Broughton BC, Berneburg M, Fawcett H, Taylor EM, Arlett CF, Nardo T, et al. Two individuals with features of both xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy highlight the complexity of the clinical outcomes of mutations in the XPD gene. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2001;10(22):2539-47.
274. Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.* 14 mars 2016;10(2):139-44.
275. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet.* mars 2011;48(3):168-76.
276. DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol.* mars 2012;132(3 Pt 2):785-96.
277. Cordonnier AM, Lehmann AR, Fuchs RP. Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol Cell Biol.* mars 1999;19(3):2206-11.
278. Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NGJ, Fawcett H, Raams A, et al. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 22 janv 2002;99(2):815-20.
279. Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan C-C, Tsilou ET, et al. Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum: long-term follow-up highlights the role of DNA repair in protection from sun damage. *Ophthalmology.* juill 2013;120(7):1324-36.
280. Natale V, Raquer H. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex. *Orphanet J Rare Dis.* 04 2017;12(1):65.
281. Narita T, Narita K, Takedachi A, Saijo M, Tanaka K. Regulation of Transcription Elongation by the XPG-TFIIH Complex Is Implicated in Cockayne Syndrome. *Mol Cell Biol.* 15 sept 2015;35(18):3178-88.
282. Wilson BT, Stark Z, Sutton RE, Danda S, Ekbote AV, Elsayed SM, et al. The Cockayne Syndrome Natural History (CoSyNH) study: clinical findings in 102 individuals and recommendations for care. *Genet Med.* 2016;18(5):483-93.
283. Rapin I, Weidenheim K, Lindenbaum Y, Rosenbaum P, Merchant SN, Krishna S, et al. Cockayne syndrome in adults: review with clinical and pathologic study of a new case. *J Child Neurol.* nov 2006;21(11):991-1006.
284. Reid-Bayliss KS, Arron ST, Loeb LA, Bezrookove V, Cleaver JE. Why Cockayne syndrome patients do not get cancer despite their DNA repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 06 2016;113(36):10151-6.
285. Kipling D, Davis T, Ostler EL, Faragher RGA. What can progeroid syndromes tell us about human aging? *Science.* 3 sept 2004;305(5689):1426-31.
286. Laugel V. Cockayne syndrome: the expanding clinical and mutational spectrum. *Mech Ageing Dev.* juin 2013;134(5-6):161-70.

287. Itoh T, Ono T, Yamaizumi M. A new UV-sensitive syndrome not belonging to any complementation groups of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome: siblings showing biochemical characteristics of Cockayne syndrome without typical clinical manifestations. *Mutat Res.* mai 1994;314(3):233-48.
288. Meira LB, Graham JM, Greenberg CR, Busch DB, Doughty AT, Ziffer DW, et al. Manitoba aboriginal kindred with original cerebro-oculo- facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene. *Am J Hum Genet.* avr 2000;66(4):1221-8.
289. Graham JM, Anyane-Yeboah K, Raams A, Appeldoorn E, Kleijer WJ, Garritsen VH, et al. Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene, with prenatal diagnosis in a triplet pregnancy. *Am J Hum Genet.* août 2001;69(2):291-300.
290. Drury S, Boustred C, Tekman M, Stanescu H, Kleta R, Lench N, et al. A novel homozygous ERCC5 truncating mutation in a family with prenatal arthrogryposis-- further evidence of genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A.* juill 2014;164A(7):1777-83.
291. Jaspers NGJ, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, et al. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet.* mars 2007;80(3):457-66.
292. Le Van Quyen P, Calmels N, Bonnière M, Chartier S, Razavi F, Chelly J, et al. Prenatal diagnosis of cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome: Report of three fetuses and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 13 févr 2020;
293. Nardo T, Oneda R, Spivak G, Vaz B, Mortier L, Thomas P, et al. A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 14 avr 2009;106(15):6209-14.
294. Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NGJ, Kurimasa A, Oshimura M, et al. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26 oct 2004;101(43):15410-5.
295. Laugel V, Dalloz C, Durand M, Sauvanaud F, Kristensen U, Vincent MC, et al. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat.* févr 2010;31(2):113-26.
296. Karikkineth AC, Scheibye-Knudsen M, Fivenson E, Croteau DL, Bohr VA. Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Res Rev.* janv 2017;33:3-17.
297. Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, Wilson DM, Bohr VA. Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol.* mars 2015;25(3):158-70.

298. Koob M, Laugel V, Durand M, Fothergill H, Dalloz C, Sauvanaud F, et al. Neuroimaging in Cockayne syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol.* oct 2010;31(9):1623-30.
299. Krols M, van Isterdael G, Asselbergh B, Kremer A, Lippens S, Timmerman V, et al. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* avr 2016;131(4):505-23.
300. Wang Y, Jones-Tabah J, Chakravarty P, Stewart A, Muotri A, Laposa RR, et al. Pharmacological Bypass of Cockayne Syndrome B Function in Neuronal Differentiation. *Cell Rep.* 22 mars 2016;14(11):2554-61.
301. Liang C, Morris A, Schlücker S, Imoto K, Price VH, Menefee E, et al. Structural and molecular hair abnormalities in trichothiodystrophy. *J Invest Dermatol.* oct 2006;126(10):2210-6.
302. Lambert WC, Gagna CE, Lambert MW. Trichothiodystrophy: Photosensitive, TTD-P, TTD, Tay syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2010;685:106-10.
303. Stefanini M, Botta E, Lanzafame M, Orioli D. Trichothiodystrophy: from basic mechanisms to clinical implications. *DNA Repair (Amst).* 2 janv 2010;9(1):2-10.
304. Zhou Y-K, Yang X-C, Cao Y, Su H, Liu L, Liang Z, et al. A homozygous G insertion in MPLKIP leads to TTDN1 with the hypergonadotropic hypogonadism symptom. *BMC Med Genet.* 31 2018;19(Suppl 1):214.
305. Faghri S, Tamura D, Kraemer KH, Digiovanna JJ. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J Med Genet.* oct 2008;45(10):609-21.
306. Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* 1 janv 2001;15(1):15-23.
307. Harrington JJ, Lieber MR. Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1 juin 1994;8(11):1344-55.
308. Constantinou A, Gunz D, Evans E, Lalle P, Bates PA, Wood RD, et al. Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 26 févr 1999;274(9):5637-48.
309. Dunand-Sauthier I, Hohl M, Thorel F, Jaquier-Gubler P, Clarkson SG, Schärer OD. The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity. *J Biol Chem.* 25 févr 2005;280(8):7030-7.
310. Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, et al. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell.* 27 avr 2007;26(2):231-43.
311. Fagbemi AF, Orelli B, Schärer OD. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 15 juill 2011;10(7):722-9.

312. Iyer N, Reagan MS, Wu KJ, Canagarajah B, Friedberg EC. Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*. 20 févr 1996;35(7):2157-67.
313. Gary R, Ludwig DL, Cornelius HL, MacInnes MA, Park MS. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem*. 26 sept 1997;272(39):24522-9.
314. Wakasugi M, Reardon JT, Sancar A. The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. *J Biol Chem*. 20 juin 1997;272(25):16030-4.
315. Staresinic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I, et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J*. 22 avr 2009;28(8):1111-20.
316. Sarker AH, Tsutakawa SE, Kostek S, Ng C, Shin DS, Peris M, et al. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell*. 28 oct 2005;20(2):187-98.
317. Klungland A, Höss M, Gunz D, Constantinou A, Clarkson SG, Doetsch PW, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell*. janv 1999;3(1):33-42.
318. Bessho T. Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 15 févr 1999;27(4):979-83.
319. Hegazy YA, Fernando CM, Tran EJ. The balancing act of R-loop biology: The good, the bad, and the ugly. *J Biol Chem*. 24 janv 2020;295(4):905-13.
320. Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aguilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell*. 18 déc 2014;56(6):777-85.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES :

### ***Culture cellulaire :***

Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) sauvages (WT) et déplétés en protéine XPG (XPG<sup>-/-</sup>) ont été cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma), supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco) et 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Corning). Les cellules MRC5-SV, XPCS1RO-SV, GM14930-SV (Coriell) et GM14931-SV (Coriell) ont été cultivées dans du DMEM (Sigma), supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco) et 10% de sérum de veau fœtal non décomplémenté (Corning). Toutes ces cellules étaient stockées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et 3% d'O<sub>2</sub> (low oxygen) afin de réduire les dommages oxydatifs. Les cellules XPCS1RO-SV+XPG-GFP ont été cultivées dans un milieu similaire avec du G418 (Sigma Aldrich) pour la sélection et conservées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***RNA Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Immunofluorescence :***

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de 18 mm, dans des plaques 6 puits, lavées au PBS et fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules ont été perméabilisées avec du PBS + Triton X-100 0,4% pendant 7 minutes à 4°C et incubées pour au moins deux heures dans du tampon de pré-hybridation (2X SSPE et 15% formamide) (20X SSPE, pH 8.0 : 3 M NaCl, 157 mM NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O et 25 mM EDTA). 3.5 µL de sonde 47S à 10 ng/µL ont été dilués dans 70 µL de tampon d'hybridation (2X SSPE, 15% formamide, 10% dextran sulfate et 0,5 mg/mL de tRNA) préalablement chauffés 1 minute à 90°C. L'hybridation a eu lieu sur la nuit en chambre humide à 37°C. Les lamelles ont ensuite été lavées deux fois 20 minutes avec du tampon de pré hybridation et une fois 20 minutes avec du SSPE 1X, avant d'être lavées au PBS puis au PBS+ (PBS, 0,5% BSA et 0,15% glycine). Les lamelles ont ensuite été incubées 2h à RT en chambre humide et à l'abri de la lumière avec 70 µL d'anticorps anti-RPA194 (clone C-1) (Santa Cruz) dilué 500 fois dans du PBS+ avant d'être lavées 3 fois cinq minutes avec du PBS et 1 fois rapidement avec du PBS+. Les lamelles ont ensuite été incubées une heure à RT en chambre humide à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire Goat anti-mouse – AlexaFluor 488 (Invitrogen A11008) et lavées 3 fois 5 minutes avec du PBS, avant d'être montées avec du Vectashield + DAPI (Vector) et scellées au vernis. Les séquences des sondes utilisées peuvent être trouvées dans les données supplémentaires. Au moins 3 réplicats biologiques ont été générés.

### ***Prise d'images et analyse :***

Les images ont été prises sur un microscope Andor Spinning disk avec un objectif 40X à huile pour les MEFs ou sur un Z1 Axioimager droit (Zeiss) avec un objectif 40x sans huile. Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ. Pour chaque condition, au moins 25 cellules ont été quantifiées en utilisant une macro développée par P-O M.

### ***Immunoprécipitation de chromatine (ChIP) :***

Les cellules ont été cultivées jusqu'à 60-80% de confluence dans des boîtes 10 cm. Elles ont été lavées au PBS à 4°C et fixées avec du formaldéhyde méthanol-free 1% dilué dans du PBS à RT (Formaldéhyde 16% Thermo Fisher 28908) pendant exactement 10 minutes sur un

agitateur à RT. La fixation a été stoppée par ajout de glycine à 0,125 M et les cellules ont été lavées au PBS puis récoltées par grattage dans du PBS + PIC 1X (cOmplete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 50X Roche 5056489001) et culotées par centrifugation à 800 G 8 minutes 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois dans la solution de lavage (0,05% détergent Active Motif 37517, PIC 1X et PBS) et centrifugées à 800 G 8 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans du PBS + PIC 1X et centrifugé à 800 G 8 minutes à 4°C. Les cellules ont été douncées avec un douncer B dans du tampon de lyse cellulaire (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% NP-40 et PIC 1X) et incubées 10 minutes sur glace. Les cellules ont été culotées par centrifugation à 800 G 8 minutes à 4°C et resuspendues dans du tampon de sonication (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA et 0,25% SDS) avant d'être soniquées avec un Covaris S220 (Covaris, Peak Intensity Power 14 watts Duty Factor 10% Cycle per Burst 200, pour 9 minutes) afin d'obtenir des fragments d'ADN d'environ 250 pb. Les échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 14 000 g afin d'éliminer les débris puis dosés avec un Quantus Fluorometer (Promega E6150). La quantité optimale de chromatine pour l'Input a été stockée à -20°C tandis que les quantités optimales de chromatine pour le Mock et l'IP ont été incubées sur la nuit à 4°C sur roue avec des billes magnétiques couplées à des protéine G (Dynabeads Protein G 10004D, Thermo Fisher) et préalablement lavées deux fois avec du DRIP Binding Buffer 1X + Tween 20 0,1% (DRIP Binding Buffer 10X : 100 mM Sodium Phosphate, pH 7, 1.4 M NaCl et 0,5% Triton X-100, filtré à 0.2 µm et dilué dans du TE 1X) et couplées plusieurs heures avec un anticorps anti-IgG murin (Diagenode, C15400001), anti-ARNPol1 (RPA-194 clone C1, sc-48385, Santa Cruz) ou anti-UBF (UBF F-9 X, sc13125 X, Santa Cruz) en quantité optimale. Après l'IP, les billes ont été lavées deux fois cinq minutes à 4°C avec du tampon RIPA Low-Salt + PIC 1X (TE 1X, 0.1 % SDS, 140 mM NaCl, 0.1 % Na-Deoxycholate et 1 % Triton X-100), deux fois cinq minutes à 4°C avec du tampon RIPA High-Salt + PIC 1X (TE 1X, 0.1 % SDS, 500 mM NaCl, 0.1 % Na-Deoxycholate et 1 % Triton X-100), deux fois cinq minutes à 4°C avec du tampon de lavage LiCl + PIC 1X (TE 1X, 250 mM LiCl, 0.5 % Na-Deoxycholate et 0.5 % NP-40) et deux fois cinq minutes à 4°C avec du TE 1X + PIC (10 mM Tris-HCl pH 8.0 et 1 mM EDTA). L'ADN et les protéines ont ensuite été élués avec un tampon d'éluion (TE 1X et 1% SDS) deux fois 20 minutes à 37°C avec agitation 1400 rpm sur un thermomixeur. Les échantillons ont été décrosslinkés 5h à 65°C avec 0.3 M de NaCl et de la protéinase K à 10 mg/mL puis 30 minutes à 37°C avec de la RNase A à 10 mg/mL. L'ADN a ensuite été extrait avec le kit QIAGEN MinElute PCR purification kit (Qiagen, ID : 28004) suivant les instructions du fournisseur. L'ADN obtenu a été dilué dix ou cent fois avant de poursuivre avec les qPCR.

#### ***DNA-RNA Immunoprecipitation (DRIP) :***

Les cellules ont été cultivées jusqu'à 60-80% de confluence dans des boîtes 10 cm. Elles ont été lavées dans du PBS, récupérées par trypsination et culottées en centrifugeant 5 minutes à 1500 rpm RT. Le culot a été resuspendu dans du PBS et l'ADN génomique a été extrait avec le kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, ID : 69504) suivant les instructions du fournisseur. La quantité optimale d'ADN a été digérée par un cocktail d'enzymes de restriction : BSA 1X, NEB Buffer 2 1X, 30 U BSRgl (NEB, R0575S), 30 U EcoRI-Hf (NEB, R3101), 30 U SspI-Hf (NEB, R3132), 30 U HindIII (NEB, R0104S) , 30 U XbaI (NEB, R0145S) et de la Spermidine 0.5X (Sigma-Aldrich, 05292-1ML-F) sur la nuit à 37°C. L'ADN ainsi digéré a été séparé en deux : la moitié a été digéré par 3,75 U de RNase H (NEB, M0297L) pendant 5h à 37°C avant d'être inactivé avec 1 µL d'EDTA 0.5 M tandis que l'autre moitié a été conservée à 4°C. Une partie de l'ADN a été stockée à -20°C (Input) et l'ADN en quantité optimale + DRIP Binding Buffer 1X, avec et sans RNaseH a ensuite été immunoprécipité sur la nuit à 4°C sur roue avec un anticorps dirigé

contre les R-loops (Anti-S9.6, Merck-Millipore, MABE1095) ou sans anticorps (Mock). Des billes magnétiques couplées à des protéines G (Dynabeads Protein G, 10004D, Thermo Fisher) ont été lavées deux fois dans du DRIP Binding Buffer 1X avant d'être ajoutées en quantité optimale aux tubes immunoprécipités. Ceux-ci ont été incubés 4h sur roue à 4°C. Les lavages ont été faits comme pour la CHIP, et l'extraction a été faite avec le kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel, ref. 740609.50). L'ADN obtenu a été dilué dix fois avant de poursuivre avec les qPCR.

#### **qPCR :**

Le nombre de cycles a été mesuré en utilisant le Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 10209284) dans une CFX-Connect (Bio-Rad, 1855201). Le programme utilisé était le suivant :

- 50°C pendant 2 minutes
- 95°C pendant 10 minutes
- 95°C pendant 15 secondes
- 60°C pendant 1 minute
- Lecture de la plaque
- 39 répétitions des 3 étapes précédentes
- 95°C pendant 15 secondes
- Melt curve entre 65°C et 95°C, incrémentation de 0.5°C pour 3 secondes et lecture de plaque

Les données obtenues ont été normalisées en pourcentage d'Inputs ou fold gene expression pour chaque couple de primers utilisés. Au moins 2 réplicats biologiques ont été générés pour chaque expérience. La séquence des primers utilisés sont disponibles dans le matériel supplémentaire.

#### **Extraction des ARN totaux :**

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant du RNAzol RT (Sigma-Aldrich, R4533), selon les instructions du fabricant. Brièvement, des cellules à 60-80% de confluence ont été récupérées dans 1 mL de RNAzol RT, centrifugées pour séparer les ARN des ADN & protéines, et les premiers ont été précipités avec de l'isopropanol 100% puis lavés deux fois dans de l'éthanol 75%. L'ARN a été dilué dans de l'eau sans être séché au préalable avant d'être dosé au Nanodrop.

#### **RiboMethSeq :**

Les ARN totaux à la concentration optimale ont été envoyés à la plateforme EpiRNASeq à Nancy où la technique a été réalisée.

#### **Northern Blot :**

4 µg d'ARN totaux ont été séparés sur un gel d'agarose 0.8 % avec 1.2 % de formaldéhyde dans du tampon T/T (30 mM Tricine (Santa Cruz, CAS 5704-04-1), 30 mM triethanolamine (Supelco, 8223415000)) avant d'être transférés sur une membrane en nylon chargée

positivement (Roche, 11-209-299-001) par transfert capillaire de haut en bas en conditions légèrement alcalines et cross-linkés sous rayonnement UV. Les membranes ont été pré-hybridées pendant une heure à 42°C avec de l'ULTRAhyb-Oligo buffer (Life/ThermoFisher, AM8663) avant d'être hybridées sur la nuit à 42°C avec 10 µM de sondes oligonucléotidiques biotinylées en 5' diluées dans de l'ULTRAhyb-Oligo buffer. Ils ont été hybridés avec des sondes associées à de la biotine en 5'. Par la suite, les membranes ont été lavées deux fois avec du tampon de lavage 1X (5X stock : 5X PBS, 2.5% SDS), trois fois avec du tampon de blocage (1X PBS, 0.5% SDS, 0.1% I-Block Reagent (Thermo Fisher, T2015)), une fois avec de la solution de conjugué (1 µL de Streptavidin-AP conjugate (Life/ThermoFisher #S921) pour 10 mL de tampon de blocage), une fois avec du tampon de blocage, trois fois avec du tampon de lavage 1X, deux fois avec du tampon essai (0.1 M diethanolamine (Supelco, 1162051000), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10.0) et recouverte de CDP-Star® Luminescent Substrate (0.25 mM Ready-To-Use) (Life/ThermoFisher, T2146) avant que le signal ne soit révélé par chimiluminescence dans un Chemidoc Touch (Bio-Rad, 1708370). Les sondes ont été retirées des membranes par deux lavages dans du NB Strip buffer bouillant (0.1X SSC, 0.5% SDS) laissé à refroidir à RT, avant de recommencer à l'étape de pré hybridation pour l'utilisation d'une autre sonde. La séquence des oligonucléotides utilisées comme sondes sont disponibles dans le matériel supplémentaire. Les signaux ont été quantifiés au moyen du logiciel ImageJ.

#### ***SUnSET :***

Des cellules à 60-80% de confluence ont été cultivées dans des boîtes 10 cm. Elles ont ensuite été traitées avec du cycloheximide (100 µM dans du DMSO) pendant 10 minutes puis avec de la puromycine (1 µM) pendant 45 minutes, avec de la puromycine seule pendant 45 minutes, ou non traitées. Les protéines ont ensuite été extraites avant d'être séparées par Western Blot.

#### ***Extraction de protéines :***

Les cellules ont été cultivées jusqu'à 60-80% de confluence dans des boîtes 10 cm avant d'être récoltées par trypsination. Elles ont été culottées par centrifugation à 2500 rpm pour 5 minutes avant d'être resuspendues dans 10 volumes de RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher, 89900) et laissées 15 minutes sur glace. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 minutes, 14000 rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré. La concentration en protéines a été mesurée par la méthode de Bradford.

#### ***Western Blot :***

50 µg d'extraits protéiques ont migré sur un gel SDS-PAGE 10% et transférés sur une membrane en nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées pendant 1h dans du PBS Tween 20 0.1% avec 5% de lait et incubées sur la nuit avec un anticorps anti-puromycine (Merck Millipore, #MABE343) dilué au 5000<sup>ème</sup> puis avec un anticorps secondaire Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcy subclass 2a specific (Jackson ImmunoResearch, #115-035-206). Les membranes ont été incubées dans de l'ECL Clarity Max (Bio-Rad, #1705062) avant d'être révélées par chimiluminescence au Chemidoc Touch. Les signaux ont été analysés avec le logiciel ImageLab (Bio-Rad).

***Analyse statistique :***

Tous les tests statistiques ont été réalisés sur GraphPad Prism version 8.1.0. n.s : non significatif ; \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $P < 0,0001$ .

## RESULTS :

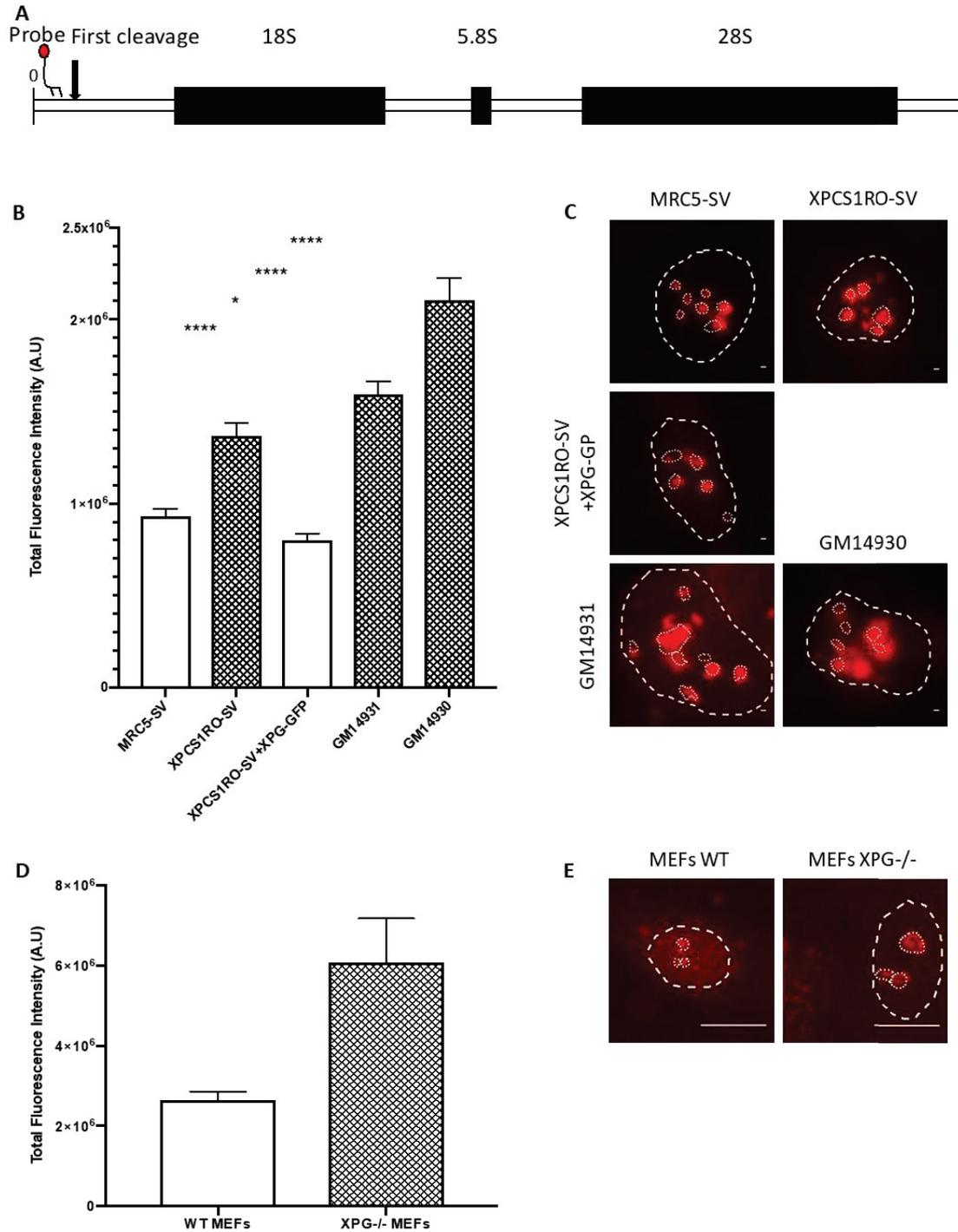
### ***47S quantity is increased in the absence of XPG.***

As the XPG protein is located in the nucleolus and associated with CSB, TFFIH and RNAP1, we wondered if its absence could have an effect on the transcriptional activity of RNAP1. To assess this, we performed RNA Fluorescence In Situ Hybridization (RNA FISH) using a specific oligonucleotide probe, directed against the 5' of the 47S rRNA, upstream of cleavage site A' (Figure 11A). This cleavage happens early in the maturation process (1), allowing us to quantify in a reliable way the RNAP1 transcriptional activity. We measured the amount of newly transcribed 47S in MRC5-SV (wild type cell line), XPCS1RO-SV (immortalized cell line derived from a XP-G/CS patient with a XPG protein containing a frameshift mutation at aa 926 and a premature stop codon at aa 980 (2)), XPCS1RO-SV+XPG-GFP (rescue cell line) (Figure S1).

Interestingly, instead of a reduction of the 47S signal, a higher level of 47S was measured in the nucleoli of XPCS1RO-SV cells. When complemented with XPG-GFP, the level of 47S rRNA decreased to a level slightly lower than in MRC5-SV cells. This surprising result prompted us to measure the 47S amount in two other independent XPG cell lines: GM14931 (Coriell), presenting a premature stop codon at aa 659 (2) and GM14930 (Coriell), presenting one allele similar to GM14931 and the other coding for a XPG protein of only 262 aa (2).

According to the results observed in XPCS1RO-SV cell line, in both the GM cell lines an increase of the level of 47S compared to the wild type cells was observed (Figure 11B). The variations in fluorescence level are calculated and shown in Figure 11C. This result suggests that in the absence of XPG, in human cells an increased amount of 47S is observed.

To verify whether this feature was common to other mammalian XPG models, we performed 47S RNA FISH in Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) (kindly provided by Dr Hoeijmakers) (3), either wild-type (WT) or depleted in XPG protein (XPG<sup>-/-</sup>). As for the human cell lines, we observed that the quantity of 47S rRNA is increased in the XPG<sup>-/-</sup> MEFs (Figure 11D), confirming that the absence of the XPG protein leads to an increase in the quantity of 47S in mammalian cells. Representative pictures of the RNA FISH assay are shown in Figure 11E. The augmentation of the 47S quantity in the nucleoli is related to the lack of a functional XPG protein, and is not cell-line specific. For the following experiments, we chose to focus on the XPCS1RO-SV cell line, as we have a rescue cell line at our disposal.



**Figure 11: Quantification of 47S pre-rRNA**

**A)** Schematic representation of rDNA unit and localisation of the 47S pre-rRNA probe. **B)** Quantification of the fluorescent signal in the nucleoli of MRC5-SV, XPCS1RO-SV, XPCS1RO-SV+XPG-GFP, GM14931 and GM14930. **C)** Representative images of each cell line of B). Per panel 1 cell is depicted and the borders of nucleus and nucleoli are depicted. Scale bar: 10  $\mu$ m. **D)** Quantification of the fluorescent signal in the nucleoli of wild-type and XPG<sup>-/-</sup> murine embryonic fibroblasts (MEFs). **E)** Representative images of each cell line of D). Scale bar: 10  $\mu$ m. Error bars represent the SEM of three independent experiments. At least 25 nuclei were quantified for each experiment. Statistical significance was determined using unpaired t-tests in GraphPad Prism 8.1.0. \*: p-value < 0,05; \*\*: p-value < 0,01; \*\*\*\*: p-value < 0,0001.

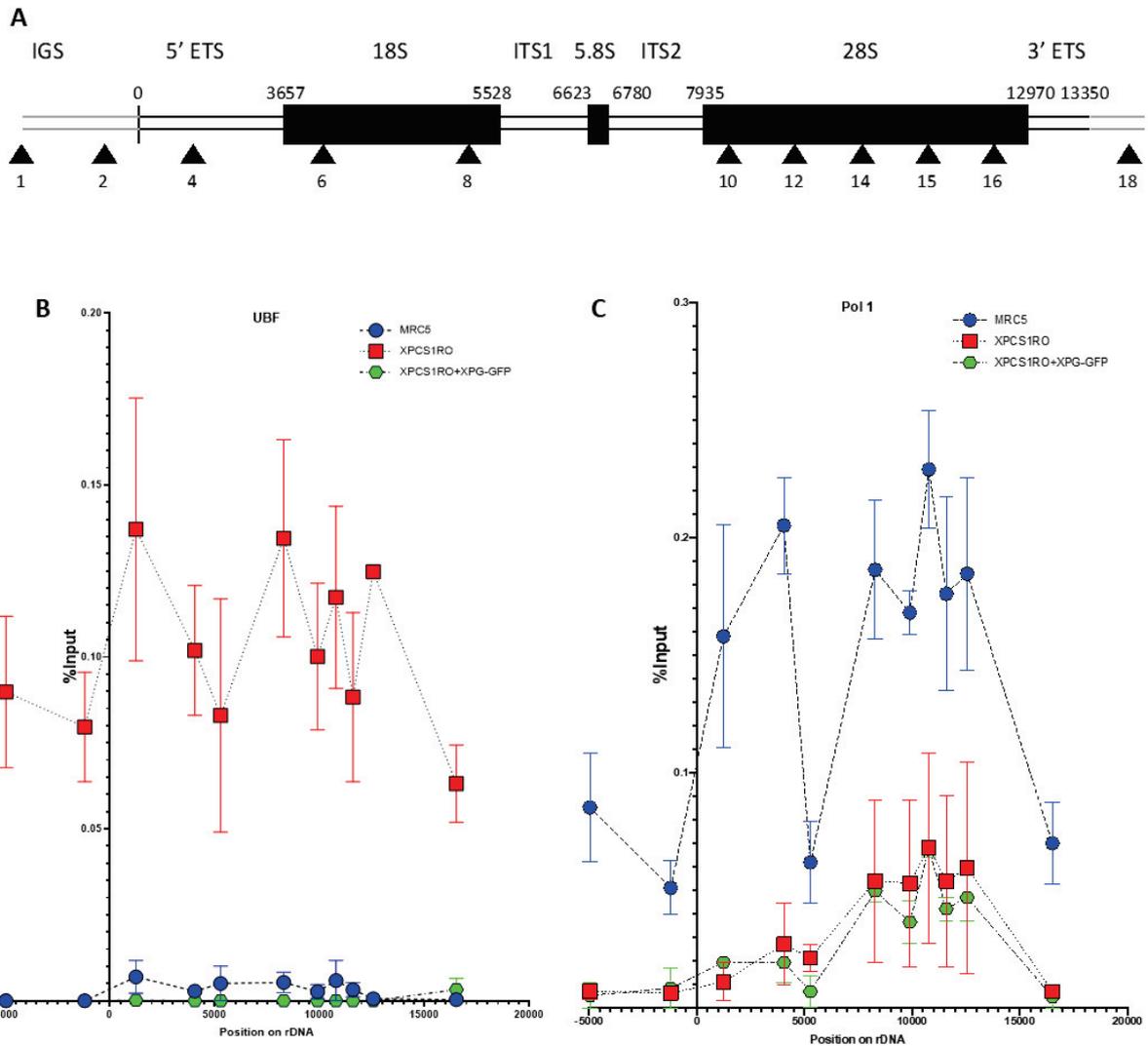
### ***The absence of XPG changes the ribosomal DNA chromatin environment.***

Following this result, we questioned the rationale that could explain this increase in 47S quantity. Two possible hypotheses were considered: either an increase of the transcriptional activity of RNAP1, leading to the production of a greater quantity of pre-rRNA 47S, or a perturbation in 47S maturation, causing an accumulation of this primary product due to the inability of the cell to properly proceed to its maturation.

To investigate whether in the absence of XPG, the Upstream Binding Factor (UBF) (4) and RNAP1 binding on the rDNAs sequences was disturbed, we performed chromatin immunoprecipitation coupled with quantitative PCR (ChIP-qPCR). 11 primers along the sequence of the ribosomal genes and in non-transcribed flanking regions were used to establish a map of the binding of these two proteins along the rDNA in WT, XPG-deficient and XPG-corrected cell lines (Figure 12A).

In the absence of a functional XPG protein, UBF binding capacity to the rDNA is higher than in the control cells. In the rescue cell line XPCS1RO-SV+XPG-GFP, UBF binding along the rDNA is similar to the profile established in the MRC5 cell line. This result shows that the binding of UBF along the rDNA may be modified in the absence of a functional XPG protein (Figure 12B). As UBF reflects the number of active copies of rDNA, the absence of a functional XPG protein may lead to an increase of the transcriptional activity of the RNAP1 by increasing the number of active copies of rDNA. Furthermore, we measured the number of basal rDNA copies by qPCR in the MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines and we observed no difference of the number of copies between XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines, implying that if there is indeed an augmentation of the number of active copies of rDNA in the XPCS1RO-SV cell line, it is solely related to the increased binding of UBF (Figure S2).

However, we observed that in the absence of a functional XPG protein, RNAP1 binding capacity to the rDNA is reduced. Intriguingly, restoring the presence of a functional XPG protein failed to increase the binding of RNAP1 back to the level of what was observed in the control cells, prompting us to think that the binding of RNAP1 to the rDNA may be more cell line-dependent than XPG-dependent (Figure 12C).



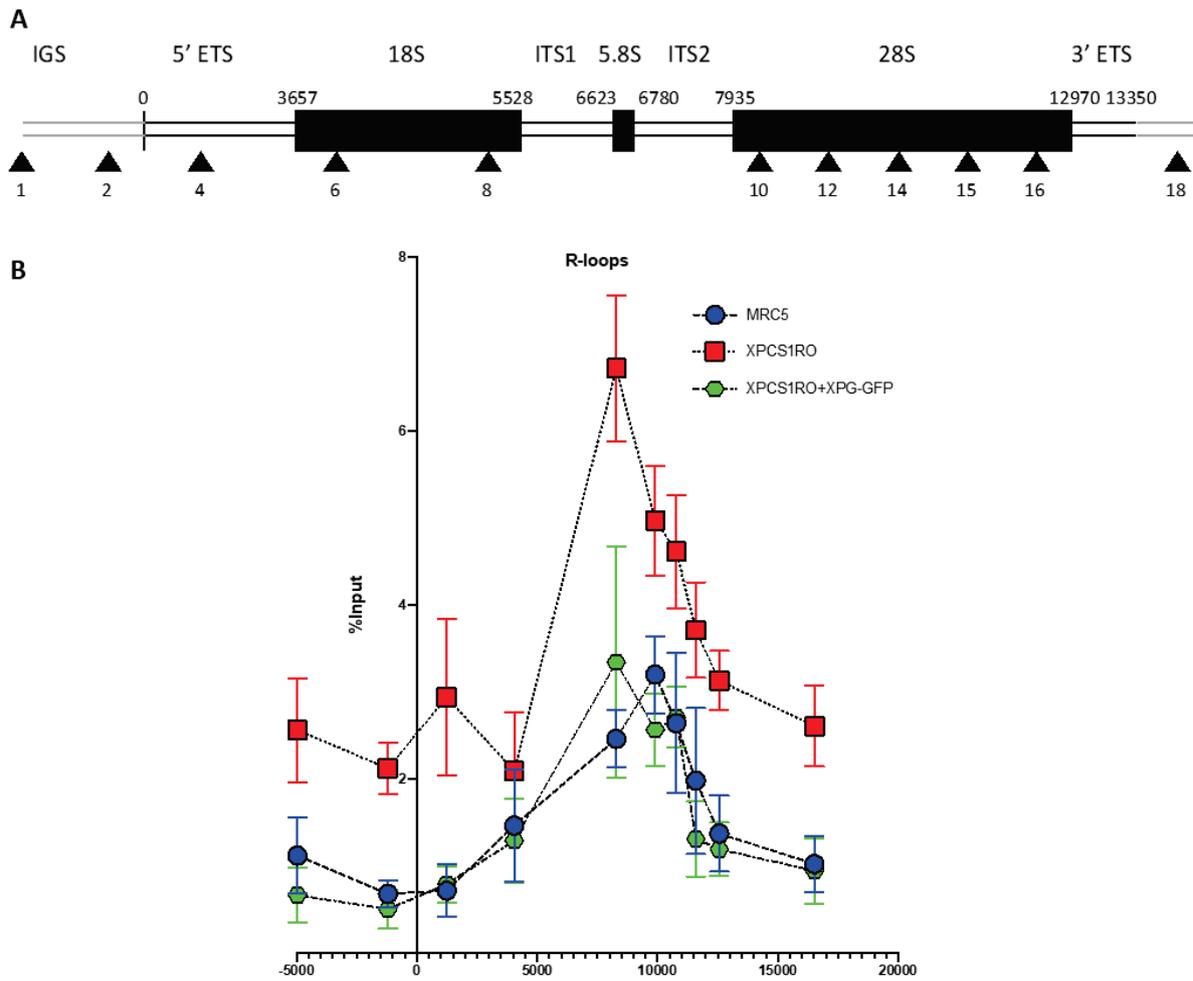
**Figure 12: Binding of UBF and RNAP1 on rDNA**

**A)** Scheme of the human rDNA unit with the position of all the primers used. **B)** ChIP-qPCR of UBF in MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. Error bars represent the SEM of two independent experiments. **C)** ChIP-qPCR of RNAPol1 in MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. Error bars represent the SEM of two independent experiments.

***R-loops are increased along rDNA sequence in absence of XPG.***

In actively transcribed regions, nascent RNA is emerging upstream of the moving RNA polymerase. This nascent RNA is naked, and can form hybrid structures when in complex with the double-stranded DNA. These hybrid structures were named R-loops, to reflect their similarity with D-loops (5). R-loops tend to form in transcriptionally active regions and/or GC-rich regions, such as ribosomal genes. Recently, it has been shown that the XPG protein was in charge of processing some of the R-loops formed upon Double Strand Breaks induction, to start a repair process known as Transcription-Associated Homologous Recombination Repair (TA-HRR) (6). In a similar fashion, XPG could be involved in the processing of R-loops produced along the rDNA, while RNAP1 is actively transcribing. To verify this hypothesis, we performed DNA/RNA Immunoprecipitation (DRIP) experiment in association with qPCR. Briefly, by using an antibody targeting R-loops following DNA digestion by an enzymatic cocktail, and proceeding as for the CHIP experiments, the profile of R-loops along the ribosomal genes was established (Figure 13A).

In the XPCS1RO-SV cell line, we measured a higher percentage of input of R-loops precipitated along the rDNA, compared to the wild-type cell line. To verify that this result depends on the absence of XPG, we performed DRIP in the rescue cell line. In XPG-GFP corrected cell line the binding profile of R-loops along the rDNA was very similar to the one established in MRC5 cells (Figure 13B). This result prompted us to think that a functional XPG protein contributes to reducing the number of un resolved R-loops along the rDNA.



**Figure 13: R-loops along the rDNA**

**A)** Scheme of the human rDNA unit with the position of all the primers used. **B)** DRIP-qPCR in MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. Signal was quantified as percentage of input DNA and normalized using controls treated with Rnase H. Error bars represent the SEM of three independent experiments.

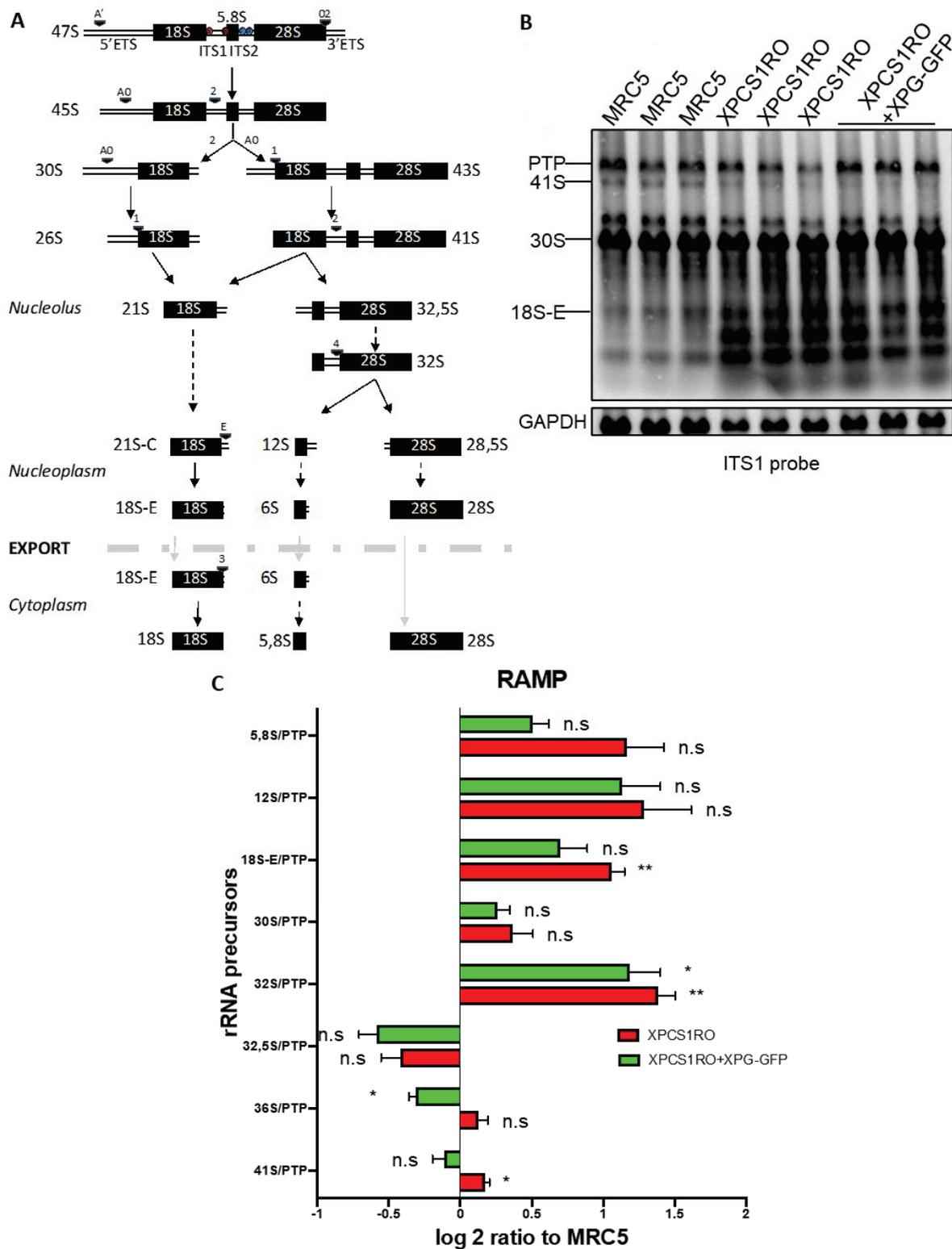
***The maturation of rRNA is impaired in the absence of a functional XPG protein.***

Following transcription, 47S ribosomal RNA is cleaved several times, ultimately leading to three mature forms: 18S, 5.8S and 28S. We hypothesized that the increase of rRNA 47S observed in the absence of a functional XPG could be a consequence of an improper maturation process. To check the validity of this hypothesis, we performed Northern Blot experiments with oligonucleotide probes hybridizing within the InterGenic Spacers, allowing us to visualize several non-mature precursors of the rRNA (Figure 14A). The resulting migration of three independent samples of RNA extracted from the MRC5-SV cell line, XPCS1RO-SV cell line and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell line can be seen in Figure 14B.

To precisely quantify the maturation of the rRNA in these three cell lines, we used the Ratio Analysis of Multiple Precursors (RAMP) (7) technique: in every cell line, we first quantified the ratio between one precursor and the Primary Transcript Plus (PTP), composed by the co-migration of 47S, 46S and 45S, at the top of the Northern Blot lane. Then, we calculated the ratio of this Precursor/PTP from either XPCS1RO-SV cell line or XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell line to its equivalent from MRC5-SV cell line, before calculating the log base 2 of this ratio. The resulting value for every precursor has been regrouped in one graph (Figure 14C). A positive value indicates an increase of the quantity of this precursor in the cell line compared to the quantity of this precursor in the MRC5 cell line, while a negative value indicates a decrease of the quantity of this precursor in the cell line compared to the MRC5 cell line.

In the absence of a functional XPG protein, we measured a slight increase of the rRNA precursor 41S. When the cell line is rescued with a functional XPG protein, the 41S rRNA precursor has a signal comparable to the signal observed in wild type cell line. The absence of a functional XPG protein increases the quantity of 41S rRNA precursor. Furthermore, in the XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell line, we measured a decrease of the quantity of 36S rRNA precursor. Both 41S and 36S rRNA precursors come from alternative cleavage pathways: thus, the absence of a functional XPG protein could guide the cell towards alternative ways of maturation, and restoring a functional protein may promote the classical pathways.

We also measured an increase of the quantity of 32S rRNA precursor in the XPCS1RO-SV cell line. In the rescue cell line, the quantity of this precursor is slightly decreased. Using Figure 4B, we can hypothesize that the XPG protein is involved in the cleavage at site 4. We would expect a decrease of rRNA precursor 12S following this impairment, which we do not have. However, an increase of both 32S and 12S precursors has been seen in literature (8). Finally, we measured an increase of the precursor rRNA 18S-E in the XPCS1RO-SV cell line. This increase was lost in the XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell line. A functional XPG protein may be required for the export or exonucleolytic trimming of this precursor. In the absence of a functional XPG protein, rRNA maturation is impaired and guided towards alternative pathways. Restoring a functional XPG protein, however, restores all the correct maturation steps except for the cleavage at site 4, which is only partially restored. The blots with the ITS1-5.8S and ITS2-b and d/e probes can be seen in Figure S3.



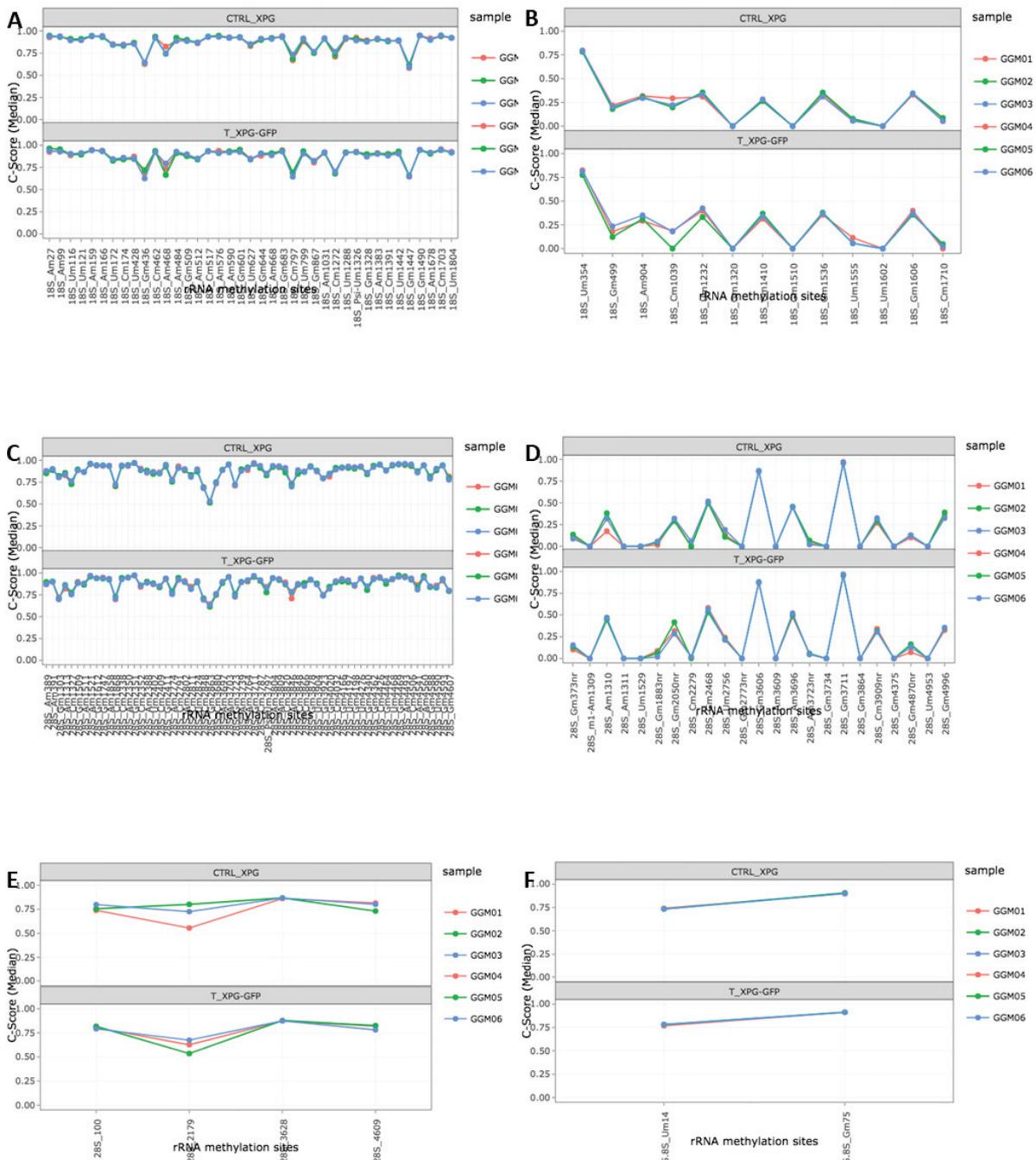
**Figure 14: Maturation of the pre-rRNAs**

**A)** Scheme of the processing of the rRNA in human cells with the location of the Northern Blot probes. a: Probe ITS1; b: Probe ITS1-5.8S; c: Probe IST2b; d: Probe ITS2 d/e; Arrows: Endonucleolytic cleavage; Dotted arrows: Action of an exoRNase; Grey arrows: Export through the nuclear membrane; Italic: Localization of the precursor; Bold: Export of the precursor; Thick grey dotted line: Nuclear membrane. **B)** Northern blot analysis of the RNA of three biological replicates of MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines with the ITS1 probe. **C)** Ratio Analysis of Multiple Precursors (RAMP) of various pre-rRNAs in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP normalized to the same ratios in the MRC5-sv. The error bars represent the SEM of 3 biological replicates. Statistical significance was determined using the Holm-Sidak method in GraphPad Prism 8.1.0, with  $\alpha = 0.05$ . n.s.: Not significant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

***A non-functional XPG protein does not affect the 2'-O-Methylation profiles of the rRNAs.***

We established that the absence of a functional XPG protein prevents proper rRNA maturation. Apart from cleavages and exonucleolytic degradations, rRNA undergoes several co- or post-transcriptional modifications. Among these post-transcriptional modifications, the most studied is probably the 2'-O-Methylation (2'-O-Me): the addition of a methyl group to the 2' hydroxyl of the ribose residue of a nucleoside. This modification has an interesting particularity: it shields the adjacent phosphodiester bonds from alkaline degradation. When total RNA is submitted to this kind of degradation and sequenced afterwards, the 2'-O-ME sites are never found as 3' or 5' ends of the obtained RNA fragments (9). By making use of this characteristic, it is possible to establish a profile of the 2'-O-Me on the rRNAs. This technique is called RiboMethSeq. We wanted to know if the impaired maturation or the lack of a functional XPG protein could have an effect on the post-transcriptional modifications undergone by the rRNAs, so we established the methylation profiles of the XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines by looking at the methylation score of known, suspected or new candidate sites of 2'-O-Me methylation in 18S, 5.8S and 28S mature rRNA.

We found no significant difference in the methylation scores for the known (Figure 15A) and suspected sites (Figure 15B) of 2'-O-Me of the 18S rRNA. No significant difference of 2'-O-Me was established for the known methylation sites (Figures 15C), suspected methylation sites (Figure 15D) or even new candidate sites (Figure 15E) for the mature 28S rRNA. Finally, we found identical methylation scores for the two 2'-O-Me methylation sites of the mature 5.8S rRNA (Figure 15F). From these data, there is clearly no involvement of the XPG protein in the process of 2'-O-Me of the mature rRNAs. Furthermore, the impaired maturation process does not seem to affect this post-transcriptional modification. Individual comparisons of each methylation sites for the 5.8S rRNA, 28S rRNA and 18S rRNA can be seen respectively in figures S4, S5 and S6.



**Figure 15: Methylation of the mature rRNAs**

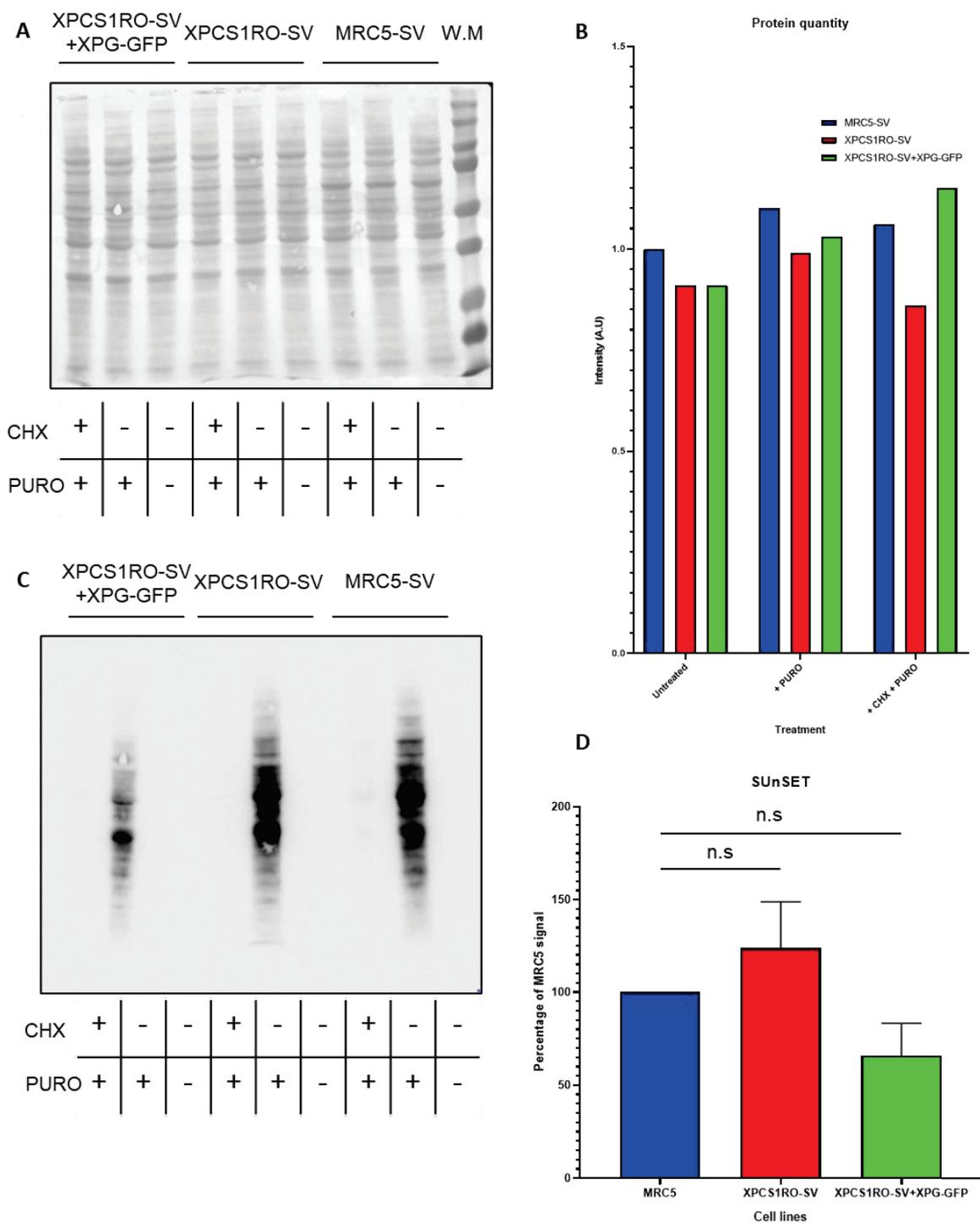
**A)** Methylation state of the known methylation sites of the 18S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **B)** Methylation state of the suspected methylation sites of the 18S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **C)** Methylation state of the known methylation sites of the 28S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **D)** Methylation state of the suspected methylation sites of the 28S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **E)** Methylation state of the new candidate methylation sites of the 28S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **F)** Methylation state of the known methylation sites of the 5.8S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. GGM01,02 and 03 represent three independent samples of XPCS1RO-SV RNA and GGM04,05 and 06 three independent samples of XPCS1RO-SV+XPG-GFP RNA. GGM01,02,03: Three biological replicates of XPCS1RO-SV; GGM04,05,06: Three biological replicates of XPCS1RO-SV+XPG-GFP; CTRL\_XPG: XPCS1RO-SV; T\_XPG-GFP: XPCS1RO-SV+XPG-GFP.

***The translational activity of the ribosomes is non-affected in the absence of a functional XPG protein.***

Finally, as we observed an impaired maturation of ribosomes, we wanted to check if the main activity of the ribosomes, the translation, was affected by the lack of a functional XPG protein.

The translation is the process by which proteins are synthesized using mRNAs as guides. Nucleotides are read as triplets, called codons, and each codon is associated with an amino acid (aa). Amino acids are carried by the transferRNA (tRNA), in the Aminoacyl-site (A) of the ribosome. The tRNA carrying an aa will be taken to the Peptidyl-site (P), where it will be stripped from its aa, before being transferred in the Exit-site (E). Amino acids will form polypeptides in the P site, polypeptides that will ultimately form proteins. It is possible to have a rough idea of the translational level by making use of the SUnSET technique (10) : it takes advantage of the structural similarity of puromycin, a nucleosidic antibiotic produced by *Streptomyces alboniger*, with an aminoacyl-tRNA. When used at a low enough concentration, puromycin is integrated in newly synthesized proteins. Afterwards, the level of puromycin integration can be measured by western blot, using the proper antibodies. MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines were treated with puromycin, with cycloheximide, a drug blocking translation, then puromycin, or not treated, before a protein extraction was performed. Resulting whole cell extracts were analyzed by Western Blots, using Red Ponceau staining to assess for equal protein quantity (Figure 16A), normalized to the untreated MRC5-SV protein extract (Figure 16B), then using an anti-puromycin primary antibody and a secondary antibody for chemiluminescence (Figure 16C). Measured signals were normalized as percentage of the signal measured in the MRC5-SV cell line (Figure 16D).

We observed no significative difference of the puromycin signal in the XPCS1RO-SV cell line compared to the MRC5-SV cell line. Likewise, we measured no difference in the quantity of integrated puromycin in the XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell line compared to the MRC5-SV cell line (Figure 16C). The + cycloheximide + puromycin lanes indicate that the puromycin signal is only translation-dependent. The lack of a functional XPG protein does not affect the translational activity of the cells, not more than the impaired rRNA maturation.



**Figure 16: Translational activity**

**A)** Red Ponceau staining of whole cell extracts from MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines, treated with puromycin, cycloheximide and puromycin, or untreated. W.M: Weight Marker; CHX: Cycloheximide; PURO: Puromycin. **B)** Quantification of staining intensity for the MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines, normalized to the staining intensity in the untreated MRC5-SV condition. A.U: Arbitrary Unit. **C)** Western Blot analysis of whole cell extracts from MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines using an antibody targeting puromycin. **D)** Quantification of the puromycin signal of the Western Blot experiment, normalized in percentage of the signal measured in the MRC5-SV + PURO condition. Error bars represent the SEM of 3 biological replicates. Statistical significance was determined using unpaired t-tests in GraphPad Prism 8.1.0. n.s. Not significant.

SUPPLEMENTARY MATERIALS :

Probe	Sequence
RNA FISH_Human_47S	Cy5-AGACGAGAACGCCTGACACGCACGGCAC
RNA FISH_Mouse_47S	Cy5-GATACGGGCAGACACAGAACAAGAGAAC

**Supplementary Table 1:** *Sequences (5' to 3') of the probes used in RNA FISH analysis.*

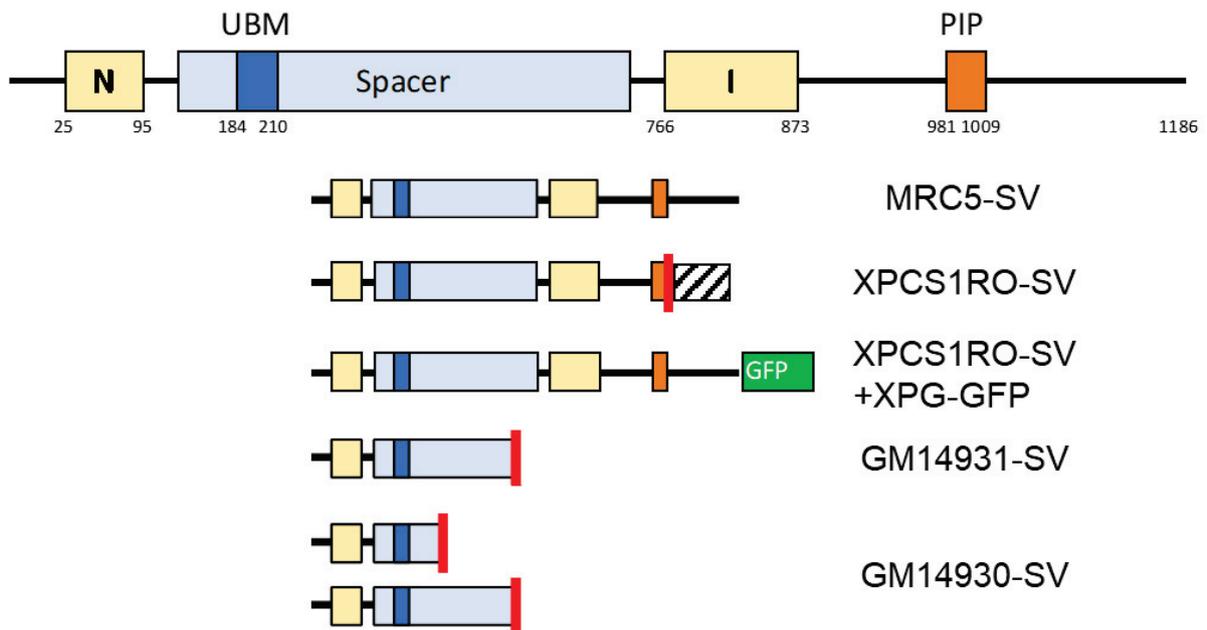
Name	Forward	Reverse	Position (bp)
Human_rDNA#1	ACCTAGCGGTCACTG TTACTC	TCAAAGTGGCGATTT CCTAG	-4957
Human_rDNA#2	TCTGTCTCTGCGTGG ATTC	AGGGAGGGAGAAA GAACAC	-1200
Human_rDNA#4	GCTCTGCCTCGGAA GGAAG	CTGCGGTACGAGGA AACAC	1241
Human_rDNA#6	GTCTGCCCTATCAAC TTTCG	ATGTGGTAGCCGTTT CTCAG	4048
Human_rDNA#8	CGTTGAACCCCATTC GTG	TATGACCCGCACTTA CTCG	5281
Human_rDNA#10	AAAGCGGGTGGTAA ACTCC	ACGCCCTCTTGA ACTCTC	8286
Human_rDNA#12	CATCAGACCCAGAG AAAGG	TGATTCGGCAGGTG AGTTG	9900
Human_rDNA#14	GGCATGTTGGAACA ATGTAGG	CCTTAGAGCCAATCC TTATCC	10781
Human_rDNA#15	CGCCTAGCAGCCGA CTTAG	GTTACTCCCGCGTT TACCC	11590
Human_rDNA#16	CAGGTTTCAGACATTT GGTG	AGGCGTTCAGTCATA ATCCC	12560
Human_rDNA#18	CATCCCCATTACCTG AGACTAC	CACATACCTACCTAC GGAAAAC	16518

**Supplementary Table 2:** Sequences (5' to 3') of the qPCR primers. Used for CHIP, DRIP, and qPCR analysis of the ribosomal DNA. Position is the middle of the PCR product, related to the transcription start site (TSS).

Probe	Sequence
NB_Human_ITS1	CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATCCTTCCGCA
NB_Human_ITS1-5.8S	CTAAGAGTCGTACGAGGTCGATTGGCGAGGGCGCT
NB_Human_ITS2b	CTGCGAGGGAACCCCCAGCCGCGCACCCGAGGAGC
NB_Human_ITS2d/e	GCGCGACGGCGGACGACACCGCGGCGTCCCGCGGGT
NB_Human_GAPDH	AGTGGACTCCACGACGTACTCAGCGCCAGCATCGCC

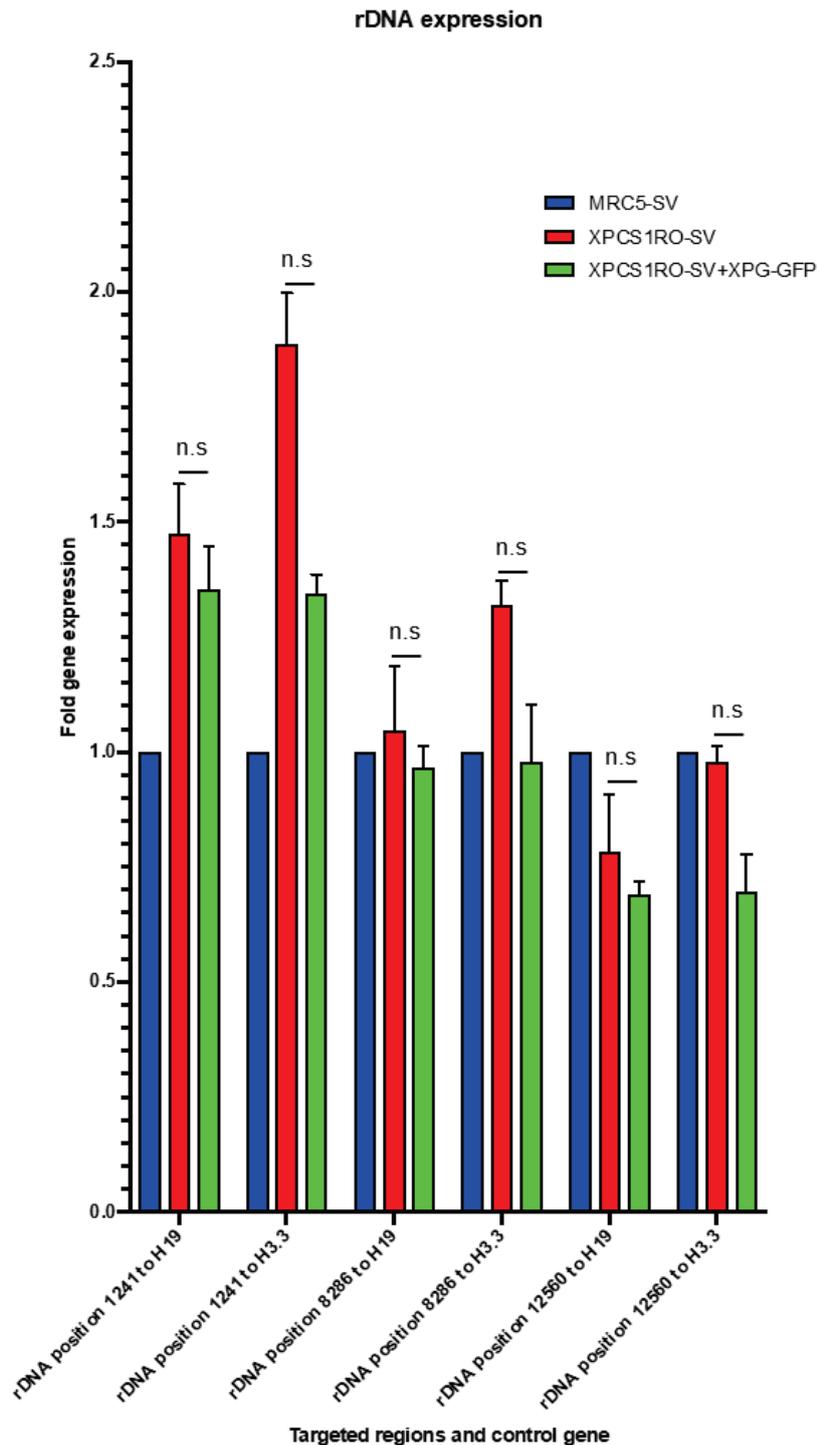
**Supplementary Table 3:** *Sequences (5' to 3') of the probes used for Northern Blot analysis.*

All probes are biotinylated in 5'.

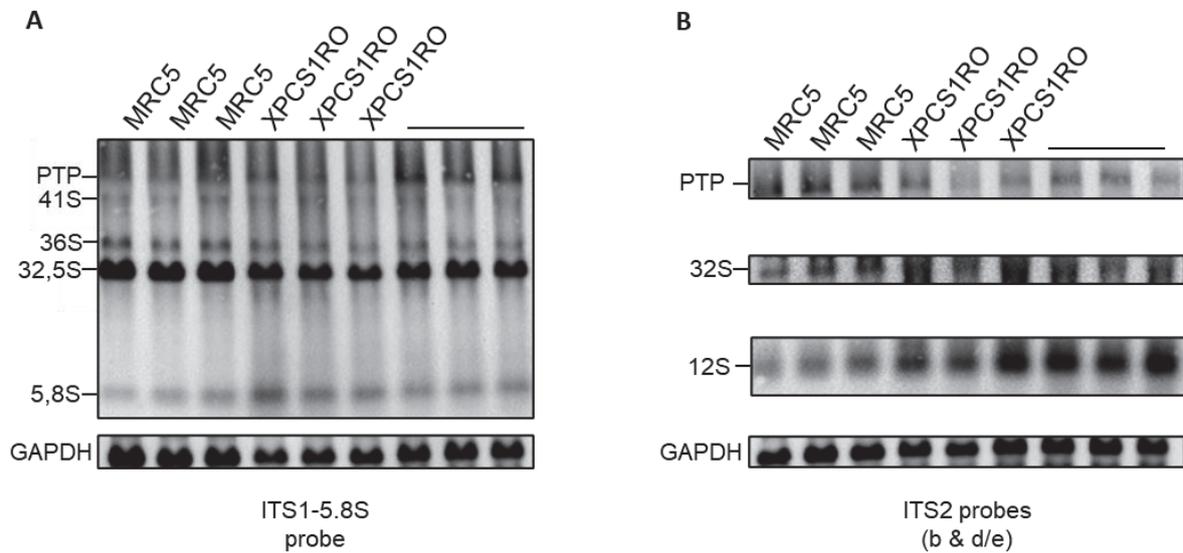


**Supplementary Figure 1: Structure of the XPG protein.**

Cartoon depicting the structure of the XPG protein in MRC5-SV, XPCS1RO-SV, XPCS1RO-SV+XPG-GFP, GM14931-SV, GM14930-SV cell lines. UBM: Ubiquitin Binding Motif ; PIP : PCNA Interacting Peptide.

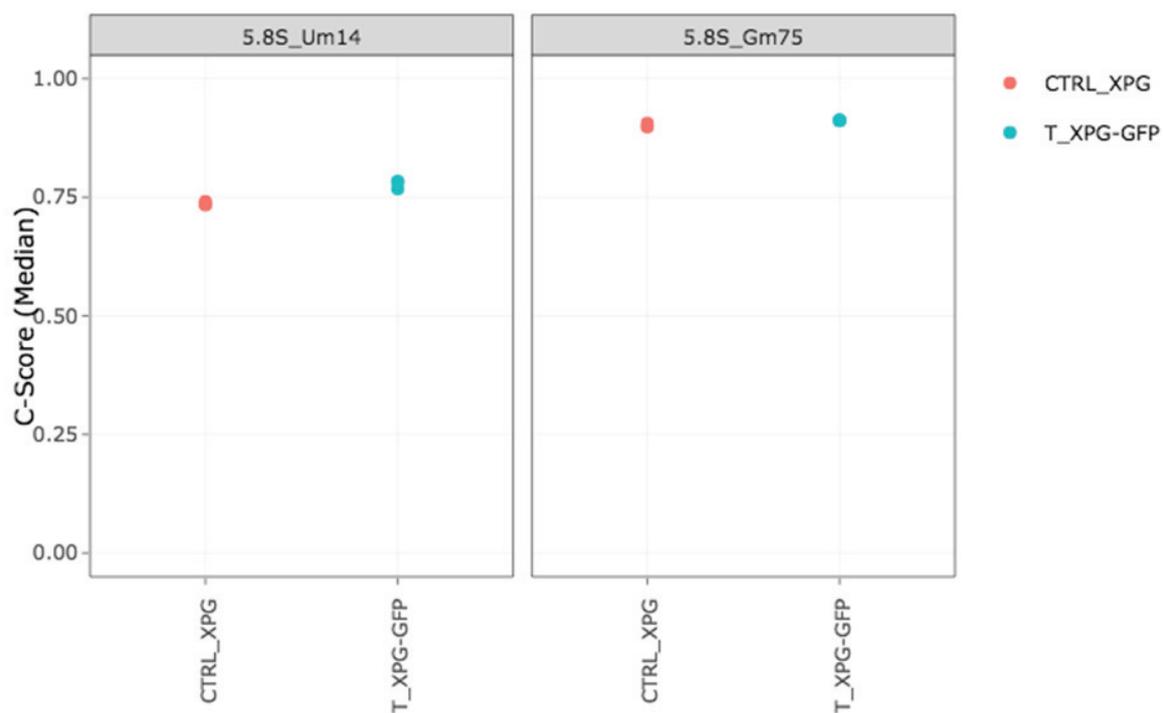


**Supplementary Figure 2:** Comparison of the basal copy number of rDNA. Fold gene expression of three rDNA regions, relatively to two housekeeping genes, in MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines. The error bars represent the SEM of 3 biological replicates. Statistical significance was determined using the Holm-Sidak method in GraphPad Prism 8.1.0, with  $\alpha = 0.05$ . n.s: Not significant.



**Supplementary Figure 3: Northern blot with *ITS2b*, *ITS2d/E* and *ITS1-5.8S* probe.**

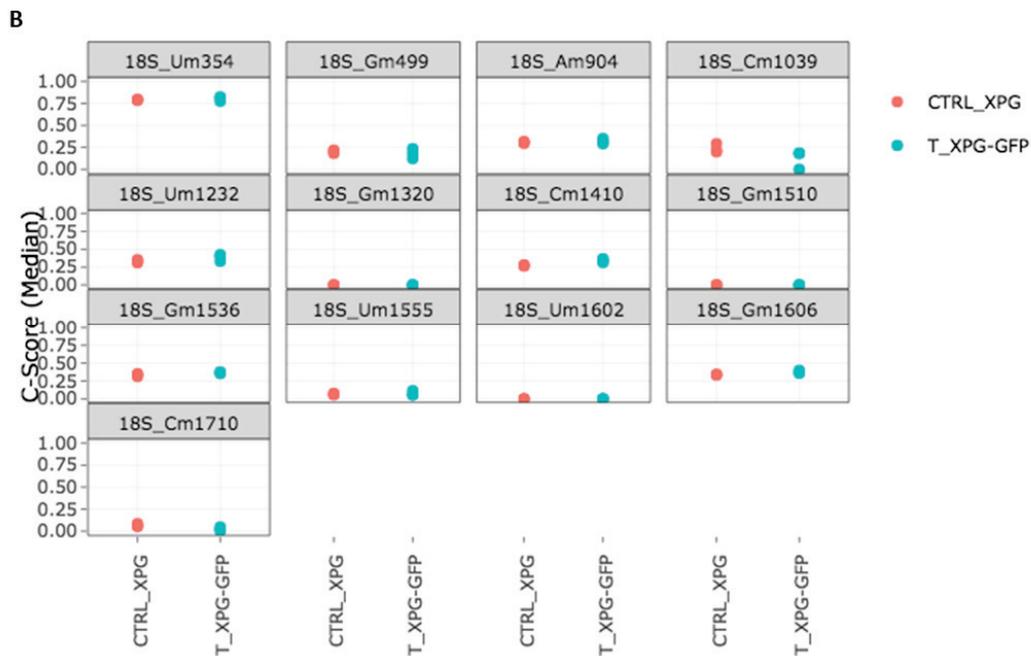
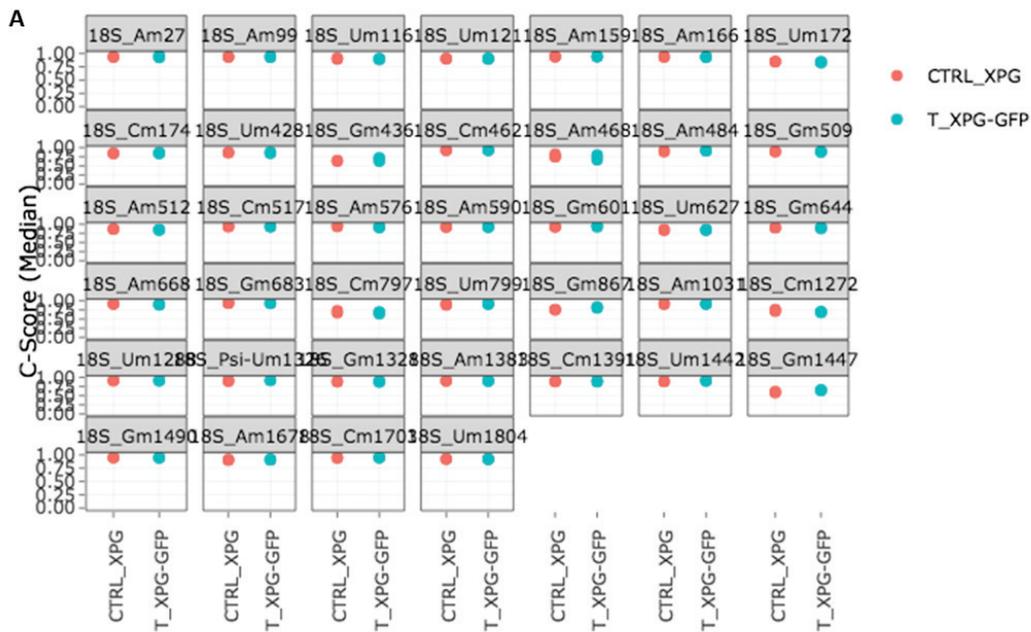
**A)** Northern Blot analysis of the RNA of three biological replicates of MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines with the *ITS1-5.8S* probe. **B)** Northern Blot analysis of the RNA of three biological replicates of MRC5-SV, XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP with the *ITS2* (*ITS2b* and *ITS2d/e*) probes.



**Supplementary Figure 4: Comparison of each methylation sites of the 5.8S rRNA.**

Methylation score of the known sites of methylation of the 5.8S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP cell lines. CTRL\_XPG: XPCS1RO-SV; T\_XPG-GFP: XPCS1RO-SV+XPG-GFP.





**Supplementary Figure 6: Comparison of each methylation sites of the 18S rRNA**

**A)** Methylation score of the known sites of methylation of the 18S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. **B)** Methylation score of the suspected sites of methylation of the 18S rRNA in XPCS1RO-SV and XPCS1RO-SV+XPG-GFP. CTRL\_XPG: XPCS1RO-SV; T\_XPG-GFP: XPCS1RO-SV+XPG-GFP.

## BIBLIOGRAPHY :

1. Cui C, Tseng H. Estimation of ribosomal RNA transcription rate in situ. *BioTechniques*. janv 2004;36(1):134-8.
2. Schärer OD. XPG: its products and biological roles. *Adv Exp Med Biol*. 2008;637:83-92.
3. van der Horst GTJ, van Steeg H, Berg RJW, van Gool AJ, de Wit J, Weeda G, et al. Defective Transcription-Coupled Repair in Cockayne Syndrome B Mice Is Associated with Skin Cancer Predisposition. *Cell*. 2 mai 1997;89(3):425-35.
4. Kwon H, Green MR. The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor, interacts directly with the TATA box-binding protein. *J Biol Chem*. 2 déc 1994;269(48):30140-6.
5. Thomas M, White RL, Davis RW. Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1976;73(7):2294-8.
6. Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, Shiotani B, Yamauchi M, Nakada S, et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell*. 04 2018;175(2):558-570.e11.
7. Wang M, Pestov DG. Quantitative Northern Blot Analysis of Mammalian rRNA Processing. *Methods Mol Biol*. 2016;1455:147-57.
8. Wang M, Pestov DG. 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Res*. mars 2011;39(5):1811-22.
9. Marchand V, Blanloeil-Oillo F, Helm M, Motorin Y. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Res*. 19 sept 2016;44(16):e135.
10. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*. avr 2009;6(4):275-7.

## DISCUSSION :

XPG est une protéine aux activités multiples : en plus de son rôle crucial dans le NER, elle semble être impliquée dans la transcription par l'ARN Polymérase 2, en étant associée à cette dernière en compagnie du complexe TFIIH et de CSB, qui sont d'ailleurs deux de ses partenaires dans le processus de réparation par excision de nucléotides (1), mais également dans la réparation par excision de bases (BER), notamment en stimulant la thymine glycol DNA glycosylase (2), ou encore dans la résolution des R-loops, des structures hybrides ARN : ADN, qui sont de plus en plus fréquemment liées aux symptômes des maladies neurodégénératives ces dernières années (3). XPG pourrait également endosser des rôles essentiels à l'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase 1, car elle a été localisée dans le nucléole, en association avec CSB et TFIIH, ses partenaires pour la transcription des ARNm par l'ARN Polymérase 2 (4). Mon projet s'est concentré sur le volet nucléolaire des activités de la protéine XPG. Mon but était de découvrir ses rôles potentiels au cours de plusieurs étapes de la biogénèse des ribosomes, un processus majeur et indispensable à la croissance cellulaire.

Les gènes ribosomiques sont présents en plusieurs centaines de copies dans la cellule. Ces copies sont localisées dans le nucléole, une organelle du noyau de la cellule eucaryote. Bien que seules certaines copies soient actives, ces gènes ribosomiques sont tout de même transcrits à un rythme effréné : les ARN ribosomiques peuvent représenter jusqu'à 80% des ARN totaux d'une cellule (5) ! Les ADNr sont situés sur le bras court des cinq chromosomes acrocentriques (13,14,15,21 et 22) et sont regroupés dans des régions appelées organisateur nucléolaire (NOR). Ces derniers sont essentiels pour la formation du nucléole, qui a de nombreux rôles nécessaires à l'homéostasie épigénétique (6). Une unité d'ADNr comporte les éléments suivants : le 5' External Transcribed Spacer (5'ETS), le futur ARNr 18S, l'Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), le futur ARNr 5.8S, l'Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), le futur ARNr 28S et enfin le 3' External Transcribed Spacer (3'ETS). Entre chaque région codante, on trouve un Intergenic Spacer (IGS), qui porte de nombreux éléments nécessaires à la régulation (7). Un gène ribosomique se compose donc de la région codante et d'un IGS. Ces gènes sont répétés des centaines de fois en tandem (Figure 4). L'ARNPol1 transcrit ces gènes ribosomiques en un seul produit, long de plusieurs milliers de nucléotides : le pré-ARNr 47S. Ce produit va ensuite subir plusieurs processus de clivages ou dégradation pour former les 3 ARNr matures, puis les ribosomes. Plusieurs dizaines de protéines sont nécessaires pour mener à bien ce projet d'envergure (8).

Nous nous sommes intéressés en premier lieu au tout début de ce projet, la transcription des ADNr en 47S. XPG avait déjà été localisée dans le nucléole, en complexe avec la Pol 1, et nous nous sommes demandés si son absence aurait des conséquences sur l'activité transcriptionnelle de la RNAPol1. Au moyen d'une sonde ciblant les premiers nucléotides du 47S, en amont du clivage au site A', couplée à un fluorochrome, nous disposons d'un moyen de quantifier l'activité transcriptionnelle de l'ARNPol1 : ce premier clivage est réalisé quelques minutes seulement après la transcription de l'ARNr 47S (9), et en s'hybridant en amont, la sonde permet d'évaluer avec fiabilité l'activité transcriptionnelle de la RNAPol1. Cette dernière a d'abord été mesurée dans une lignée cellulaire humaine dérivée de patients XP-G/CS, et dans la même lignée complétée avec une forme sauvage de la protéine XPG, associée à de la GFP afin d'avoir une confirmation visuelle de l'expression de la protéine XPG exogène dans les cellules. A notre grande surprise, nous avons observé que l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle conduit à une augmentation de la quantité de pré-ARNr 47S. De

plus, dans le cas où des cellules exprimant la forme tronquée d'XPG sont complétées avec une protéine XPG sauvage, on retrouve une quantité de 47S similaire à celle présente dans les cellules sauvages (Figure 11B). Nous avons souhaité vérifier si ce résultat était lignée-cellulaire dépendant ou syndrome dépendant, en utilisant les lignées cellulaires GM14931-SV et GM14930-SV, dérivées de deux autres patients atteints du syndrome XP-G/CS. Dans ces lignées cellulaires, nous avons également retrouvé l'augmentation de la quantité de 47S présente dans la lignée XPCS1RO-SV (Figure 11C). Nous nous sommes ensuite demandé si la même situation se retrouvait chez d'autres mammifères, et nous avons réalisé l'expérience de RNA FISH dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) sauvages ou déplétés en protéine XPG. Nous avons à nouveau observé une augmentation de la quantité de 47S en l'absence de la protéine XPG (Figure 11D). Ce résultat a clairement établi un pattern dans les cellules de mammifère : l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle conduit à une augmentation de la quantité de pré-ARNr 47S, et restaurer la protéine XPG contribue à diminuer la quantité du 47S à son niveau basal. Pour expliquer cet état de fait, nous avons émis deux hypothèses : soit la protéine XPG réprime la transcription par l'ARN Polymérase 1, et son absence contribue à augmenter l'activité transcriptionnelle de cette polymérase, soit la protéine XPG est impliquée dans la maturation des ARNr ribosomiques, et son absence empêche la maturation du 47S, conduisant *de facto* à son accumulation dans le nucléole de la cellule.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la première hypothèse, celle d'un rôle d'XPG dans la transcription. Afin d'établir une capture d'écran de l'environnement chromatinien, nous avons utilisé la technique de l'immunoprécipitation de chromatine associée à la qPCR. Nous avons choisi d'observer la façon dont deux protéines étaient liées aux gènes ribosomiques et aux régions alentour (Figure 12A) en présence et en absence d'une protéine XPG fonctionnelle : UBF et la RNAPol1. UBF est un membre de la famille séquence-non spécifique groupe à haute mobilité (HMG). Il est à la racine de la transcription par l'ARN Pol 1, en recrutant SL1 (10) ; c'est d'ailleurs la seule activité transcriptionnelle dans laquelle il est impliqué (11). De plus, il permet la formation d'une structure proche des nucléosomes, l'enhancesome, modifiant par la même occasion la vitesse de transcription des gènes ribosomiques (12), en plus de stimuler à la fois l'échappement du promoteur (13) ou la phase d'élongation de la transcription (5). Ce qui est encore plus intéressant avec cette protéine, c'est qu'elle reflète le nombre de copies actives des rDNA (14). En absence d'XPG, nous avons constaté qu'il y avait plus d'UBF lié aux gènes ribosomiques. Dans la lignée cellulaire « rescue », cette augmentation de la quantité d'UBF liée aux gènes ribosomiques est perdue, pour un retour aux valeurs observées dans les cellules sauvages (Figure 12B). Au vu de ce résultat, nous avons émis l'hypothèse d'un plus grand nombre de copies actives dans les cellules XPCS1RO-SV, ce qui induirait donc une augmentation de l'activité transcriptionnelle et donc une plus grande quantité de 47S dans les cellules. Le nombre de copies de rDNA étant variable entre les individus (15), nous ne pouvions pas exclure que ce taux de liaison d'UBF plus important soit dû à une variation « basale » du nombre de copies. Cependant, des qPCR réalisées avec des amorces localisées sur les gènes ribosomiques ainsi qu'avec deux gènes de ménage ont permis de montrer qu'il n'existait aucune différence significative du nombre de copies de manière basale (Figure S2) et que l'augmentation/la diminution du nombre de copies actives reflétées par ce taux de liaison d'UBF était bien dépendante de l'absence/la restauration d'une protéine XPG fonctionnelle.

Toutefois, nous avons obtenu un résultat plus surprenant concernant la liaison de l'ARN Polymérase 1 aux gènes ribosomiques : celle-ci était plus faible en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle. De plus, secourir la lignée avec une protéine XPG fonctionnelle ne permet pas de restaurer le taux de liaison de la RNAPol1 observé dans les cellules sauvages (Figure 12C). Le taux de liaison de la Polymérase 1 aux gènes ribosomiques pourrait donc être plutôt cellule-dépendant que XPG-dépendant. Afin d'expliquer le résultat obtenu concernant la liaison accrue de la protéine UBF aux ADNr, nous avons émis l'hypothèse suivante : XPG étant capable de plier l'ADN (16), il pourrait être un facilitateur de la transcription par l'ARNPol1, contribuant à permettre une transcription efficace en modifiant la conformation des gènes ribosomiques. En conséquence, l'absence d'XPG pourrait perturber l'avancée de la transcription des gènes ribosomiques. Pour compenser cette diminution de la transcription sur un gène donné, la cellule pourrait augmenter le nombre de copies actives de gènes ribosomiques, ce qui expliquerait la présence augmentée d'UBF sur les rDNA, afin de maintenir le niveau transcriptionnel. En imaginant que d'autres processus soit dérégulés, on pourrait imaginer une surcompensation par l'activation de trop nombreuses copies, et donc une surproduction d'ARNr 47S conduisant à l'augmentation que nous avons mesurée précédemment. Fait intéressant, un mutant UBF gain-de-fonction a été observé récemment chez sept individus non liés génétiquement (17). Ce mutant était plus fortement lié au promoteur de l'ADNr ainsi qu'au 5'ETS, sans pour autant affecter le niveau de liaison de plusieurs composants de l'ARNPolymérase 1. Ce gain de fonction a été associé à une augmentation significative de l'ARNr 18S, et, surtout, à une dégénérescence neuronale progressive durant l'enfance des patients affectés. En conséquence, l'augmentation du taux de liaison d'UBF aux gènes ribosomiques en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle pourrait expliquer les symptômes de neurodégénérescence observés chez les patients XP-G/CS.

Les régions très actives transcriptionnellement ou riches en G/C sont des terrains fertiles pour les R-loops, des structures formées lorsqu'un brin d'ARN nu, nouvellement synthétisé, s'associe à l'ADN double brin en amont d'une polymérase en cours de transcription. Les gènes ribosomiques remplissant ces deux critères, il n'est donc pas surprenant que des R-loops s'y forment fréquemment. Dans plusieurs cas de figures, la protéine XPG, de par son activité endonucléase, a été impliquée dans la résolution des R-loops (18,19). Les R-loops pouvant perturber la transcription par l'ARN Polymérase 1 (20), nous avons cherché à mesurer la présence de R-loops sur les gènes ribosomiques en présence et en absence d'une protéine XPG fonctionnelle. En utilisant la technique de DNA:RNA ImmunoPrecipitation (DRIP), combinée avec des qPCR ciblant les gènes ribosomiques au moyen des amorces précédemment utilisées (Figure 13A), nous avons pu établir un profil des R-loops le long des gènes ribosomiques (Figure 13B). Dans les XPCS1RO-SV, nous avons mesuré plus de R-loops sur les gènes ribosomiques, et secourir la lignée cellulaire a permis de ramener la présence de R-loops non résolus à des valeurs proches de celle des cellules sauvages. Une protéine XPG fonctionnelle permet donc de réduire la quantité de R-loops non résolus le long des gènes ribosomiques. On peut toutefois se demander si la réduction est directement liée à l'action de la protéine XPG, qui clive les R-loops directement, ou si elle est indirecte et liée à la diminution de l'activité transcriptionnelle causée par la restauration d'une protéine XPG fonctionnelle. Afin de répondre à cette question, nous pourrions réaliser les expériences de CHIP-qPCR et de DRIP-qPCR sur des cellules XPCS1RO-SV, complétées avec un XPG catalytiquement inactif avec une mutation en position 791. L'acide glutamique devient une alanine. Si cet acide aminé est essentiel pour l'activité catalytique d'XPG, cette forme de

la protéine reste néanmoins capable d'accomplir tous les rôles non catalytiques de la protéine (21). Ceci nous permettrait de vérifier si l'activité catalytique de la protéine XPG est nécessaire pour accomplir son rôle dans la répression de la transcription et la résolution des R-loops le long des gènes ribosomiques.

Les R-loops ont un rôle ambigu : s'ils peuvent parfois réguler l'expression génique, par exemple en protégeant les régions promotrices de la méthylation (22), en induisant la terminaison de la transcription sur les régions 3' (23) ou favoriser des motifs chromatinien répressifs (24), ils peuvent également menacer le bon fonctionnement de la transcription : dans le cas des gènes ribosomiques, une ARN Pol 1 peut être bloquée par des R-loops, ce qui amène à l'effondrement chromosomique (20). De plus, une accumulation de R-loops commence à être vue comme une des causes possibles de plusieurs maladies neurodégénératives. C'est le cas notamment pour les maladies associées à la répétition d'un triplet de nucléotides : la chorée de Huntington (répétition de motifs CAG), le syndrome de l'X fragile type A ou E (CCG et CGG, respectivement) ou encore l'ataxie de Friedreich (GAA), dont les régions répétées sont riches en C/G et très sensibles à l'accumulation de R-loops, parfois même dans une configuration dite « double R-loops » (25). Les répétitions au niveau de C9orf72 (GGGGCC)-(GGCCCC) sont également rendues instables par une accumulation de double R-loops, ce qui provoque la sclérose latérale amyotrophique ou une dégénérescence lombaire fronto-temporale (DLFT) (25). L'ataxie avec une apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2) est une maladie neurodégénérative causée par la mutation de la Senataxine (SETX), une hélicase nécessaire à la résolution des R-loops. Dans cette maladie, l'expression des gènes neuronaux est modifiée, et de nombreux R-loops sont présents sur ces gènes (26). Enfin, parmi les syndromes liés aux R-loops, l'anémie de Fanconi (FA), provoquée par la perte d'une protéine de la voie FA, est intéressante dans notre cas. En cas de perte de la voie FA, les R-loops s'accumulent dans les cellules, provoquant une augmentation du nombre de blocage des fourches répliquatives et des cassures de l'ADN (27,28). FANCI, l'une des protéines de cette voie, a été localisée dans le nucléole où elle est physiquement impliquée dans la transcription du pré-ARNr47S mais aussi dans la maturation des ARNr de la grande sous-unité du ribosome (29). L'anémie de Fanconi est une maladie héréditaire qui affecte la moelle osseuse, et les patients présentent très tôt dans l'enfance une anémie aplastique, des altérations congénitales, et leurs cellules sont hypersensibles à des agents nocifs comme le diepoxybutane (DEB) ou la mitomycine C (MMC) (30,31). Une accumulation de R-loops ainsi qu'une perturbation de la biogénèse des ribosomes pourraient donc causer des symptômes multiples, eu égard à l'importance capitale des ribosomes dans la production protéique. Rapprocher XP-G/CS des ribosomopathies pourrait, de plus, permettre d'élargir les pistes thérapeutiques potentielles.

De plus, les résultats obtenus dans nos expériences de DRIP-qPCR font écho à des découvertes récentes : il a été montré que l'ARNPol2 pouvait « diriger » la transcription Pol1 dans le nucléole. En effet, la Pol 2 et SETX génèrent un bouclier constitué de R-loops dans les IGS, et ce bouclier empêche l'ARNPol1 de transcrire les IGS et de former des ARN intergénomiques sens non-codants (sincRNA) (32), qui perturberaient l'organisation du nucléole ou l'expression des ADNr. L'accumulation de R-loops sur les régions codantes, en l'absence d'XPG, pourrait causer un phénomène similaire de « bouclier », empêchant la liaison correcte de l'ARNPol1 aux gènes ribosomiques. En conséquence, une diminution de l'activité transcriptionnelle, et la cellule activerait donc plus de copies de rDNA, ce qui expliquerait l'augmentation du taux d'UBF lié aux gènes ribosomiques évoquée plus haut. Une

surcompensation de l'activité transcriptionnelle causerait l'augmentation de 47S observée. Cependant, le niveau de liaison similaire de l'ARN Pol 1 aux gènes ribosomiques dans les cellules secourues constitue un point faible de cette hypothèse. Toutefois, comme les taux de liaisons d'UBF, reflétant le nombre de copies actives, de même que la quantité de R-loops non résolus le long des ADNr, sont identiques entre les cellules complémentées et les cellules sauvages, et qu'on constate également une baisse de la quantité de 47S, le niveau de liaison de Pol 1 peut être dû à une capture à des instants différents de la transcription, puisque le crosslinking avec le formaldéhyde utilisé dans la technique de CHIP fige les protéines sur l'ADN à un instant donné. On pourrait imaginer que dans le cas des cellules « rescue », le crosslinking ait été fait à un moment où le taux d'occupation de l'ARN Polymérase 1 était relativement faible. En plus de son potentiel rôle en lien direct avec la transcription, XPG pourrait également faciliter la progression de l'ARN Pol 1 le long des ADNr en réduisant le nombre de R-loops et le stress induit sur la cellule.

Notre seconde hypothèse concernant l'accumulation du 47S était un déficit potentiel de la maturation : l'absence de la protéine XPG pouvait causer l'absence de certaines protéines ou la non-réalisation de certains mécanismes, prévenant la maturation et provoquant l'accumulation du premier transcrit des gènes ribosomiques. Afin d'observer la maturation, nous avons réalisé des expériences de Northern Blot avec des sondes couplées à de la biotine et dirigées contre les Intergenic Transcribed Spacers de l'ADN ribosomique (Figure 14A) (33). Cibler ces régions permet de visualiser de multiples transcrits intermédiaires avec une seule sonde. Pour analyser les résultats, nous avons utilisé la méthode RAMP, qui permet une quantification précise de la maturation *per se* : en premier lieu, chaque transcrit intermédiaire est normalisé sur le premier transcrit, pour compenser les éventuelles différences de quantité d'ARN initiale, puis est normalisé sur la cellule « contrôle ». Calculer le log base 2 de ce ratio permet d'uniformiser les résultats afin de pouvoir visualiser avec précision les différences dans la maturation entre plusieurs conditions cellulaires (Figure 14C) (34). La première chose intéressante à tirer de ce graphique est l'augmentation de la quantité de 41S en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle. Lorsque qu'on complémente les cellules avec une forme sauvage de la protéine XPG, on retrouve une quantité de 41S similaire à celle observée dans les cellules sauvages. L'ARNr 41S provient d'une voie de clivage alternative, et se forme lorsque les clivages au site A0 puis 1 se produisent avant le clivage au site 2 (Figure 6), une situation minoritaire dans les cellules HeLa saines (35,36). La cellule semble donc plus susceptible à des voies de maturation alternatives en l'absence de la protéine XPG. Cette hypothèse se confirme par l'observation du précurseur ARNr 36S : si l'on n'observe pas de différence dans les cellules XPCS1RO-SV, on mesure en revanche une diminution de ce précurseur en cas de complémentation de cette lignée avec la protéine XPG fonctionnelle. Le précurseur ARNr 36S est également issu d'une voie de maturation alternative, lorsque l'ARNr 41S est clivé au site E avant le site 2 (Figure 7). Restaurer la protéine XPG semble donc permettre à la cellule de favoriser de nouveau les voies de maturation principales relativement aux voies alternatives.

Cette analyse RAMP nous a également permis de constater une augmentation de la quantité du précurseur 32S dans notre lignée XPCS1RO-SV comparée à la lignée MRC5-SV. Lorsque l'on restaure la protéine XPG fonctionnelle dans les cellules XPCS1RO-SV, on remarque une légère baisse de la quantité de ce précurseur, sans toutefois restaurer totalement la quantité contrôle. Le précurseur 32S provient de la dégradation par une exoRNase du 32.5S, un précurseur à la durée de vie très courte, pour lequel nous n'avons

mesuré aucune différence entre les différentes lignées. Le précurseur ARNr 32S sera clivé au niveau du site 4, et à l'issue de ce clivage se formeront le précurseur 12S, dans la voie de l'ARNr 5.8S et le précurseur 28.5S, dans la voie de l'ARNr 28S. Dans le cadre d'une analyse RAMP, l'accumulation d'un précurseur indique que le moyen de maturation de ce précurseur (clivage endonucléolytique et/ou dégradation exoRNAsique) ne peut être correctement réalisée dans les conditions observées. En l'occurrence, en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle, on observe une perturbation du clivage au site 4. Et secourir la lignée ne restaure que partiellement ce clivage. Deux hypothèses sont possibles : premièrement, XPG peut être directement impliquée dans ce clivage au site 4. En effet, cette protéine est membre de la superfamille FEN1, précédemment identifiée comme capable de cliver de l'ARN (37). Une seconde hypothèse implique un partenaire potentiel pour la protéine XPG : la protéine XRN2. Tout d'abord, XRN2 est impliquée dans la résolution de certains R-loops (38). Tout comme XPG, elle joue un rôle dans la transcription par la Pol 2, à une étape différente de la transcription toutefois (39,40). De plus, les deux protéines jouent un rôle important pour le processus de réparation par recombinaison homologue (HRR) (41,42). Enfin, elle est notamment impliquée dans la terminaison de la transcription par l'ARN Polymérase 1 (43). Comme évoqué brièvement dans la partie Résultats, des résultats précédents ont montré une accumulation des précurseurs 32S et 12S en l'absence de cette protéine (44). Si dans notre cas, l'on ne retrouve pas d'augmentation significative du précurseur ARNr 12S, les valeurs dans les deux lignées XPCS1RO-SV ont tout de même une tendance plus élevée que dans la lignée contrôle. Un autre argument en faveur d'une association XRN2-XPG est la diminution de la quantité du précurseur ARNr 36S en cas de restauration d'une protéine XPG fonctionnelle : ce précurseur subit une dégradation exoRNAsique par... XRN2 ! L'absence de cette protéine conduit d'ailleurs à une accumulation de 36S et de 41S (36). Le lien entre XPG et XRN2 semble donc être une piste à privilégier afin de comprendre plus en détail ces conséquences de l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle sur la maturation de l'ARN ribosomique. On pourrait imaginer inactiver XRN2, par exemple au moyen d'un petit ARN interférent (siARN) dans des cellules XPCS1RO-SV+XPG-GFP, et observer l'effet sur la maturation par Northern Blot.

Enfin, cette analyse RAMP nous a permis d'observer une augmentation de la quantité du précurseur ARNr 18S-E en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle. Restaurer cette protéine permet d'abolir cette augmentation. Le précurseur 18S-E est issu du clivage au site E du précurseur 21S-C et il est clivé au niveau du site 3 pour former l'ARNr 18S mature (Figure 6). De manière intéressante, lorsque le clivage au site E a lieu avant celui au site 2, on observe son accumulation dans la cellule. Cet état de fait renforce notre hypothèse d'une augmentation des clivages alternatifs en l'absence de la protéine XPG (45). Afin qu'il puisse poursuivre sa maturation, la ribonucléase spécifique poly-A (PARN) doit d'abord dégrader quelques nucléotides du 18S-E, dans le noyau (46), avant un dernier clivage endonucléolytique réalisé par NOB1 dans le cytoplasme (47,48), après l'export du 18S-E traité par PARN. Jusqu'à présent, XPG n'a été localisé que dans le noyau et les nucléoles, ce qui a priori l'empêche d'intervenir directement dans les étapes cytoplasmiques de cette maturation. Son éventuelle influence doit donc avoir lieu dans le noyau. Le 18S-E est un substrat plutôt riche en GC comparé aux substrats habituels de PARN, et l'un des candidats potentiels pour adapter le 18S-E aux exigences de PARN est la poly-(A) polymerase PAPD5, qui assiste PARN pour son rôle dans le traitement des petits ARN nucléolaires (snoRNA) (46). Au vu de ses activités potentielles, XPG pourrait potentiellement participer à rendre le 18S-E PARN-compatible en clivant une partie de sa séquence. Tout comme pour les expériences de DRIP, réaliser ces

expériences avec la lignée cellulaire XPCS1RO-SV complémentées avec une protéine XPG catalytiquement inactive pourrait permettre de vérifier si l'endonucléase a un rôle actif dans la maturation des ARNr, ou plutôt un rôle structurel.

Nous avons observé que restaurer la protéine fonctionnelle XPG-GFP dans la lignée XPCS1RO-SV contribuait à régler tous les problèmes dans la maturation des ARNr ribosomiques, à l'exception de l'accumulation du précurseur ARNr 32S : certes, sa quantité est légèrement diminuée, mais la différence avec les cellules MRC5-SV reste élevée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela : tout d'abord, notre lignée rescue n'exprime pas à 100% la protéine XPG-GFP. Sur la population observée donc, la tendance pourrait rester à une quantité supérieure de précurseur ARNr 32S. Une autre hypothèse est la particule GFP associée à la protéine XPG : de par la contrainte spatiale qu'elle ajoute, elle pourrait perturber la participation de cette protéine à ce processus particulier de la maturation. Il a déjà été observé pour d'autres protéines la possibilité de jouer certains de leurs rôles, mais pas tous, lorsqu'associées à la GFP : c'est par exemple le cas de la protéine RAD51, qui, lorsqu'associée à la GFP en position carboxy-terminale, peut participer à la réplication de l'ADN mais pas à la recombinaison homologue ni à la réparation des dommages à l'ADN dans des cellules souches embryonnaires de souris (49). Un moyen de vérifier cette hypothèse serait d'utiliser une lignée cellulaire XPCS1RO-SV complémentée avec la forme sauvage de la protéine XPG simplement associée à un tag HA, beaucoup moins contraignant spatialement, et d'observer le déroulement de la maturation de l'ARNr dans ces conditions. Une autre expérience intéressante à réaliser serait celle du Polysome Profiling : par migration sur gradient de sucrose, il est possible d'établir des profils précis avec le nombre de petites sous-unités ribosomiques, de grandes sous-unités ribosomiques, mais aussi de polysomes, afin d'avoir une illustration précise du pool de ribosomes matures dans une condition donnée. Si l'absence de la protéine XPG perturbe la maturation des ARNr, alors il est fortement probable que le profil des polysomes soit différent en l'absence de cette protéine.

Les ARNr subissent de nombreuses modifications co- ou post-transcriptionnelles au cours de la biogénèse des ribosomes : 130 méthylations et pseudouridylations ont été visualisées sur la structure du ribosome mature (50). Parmi les modifications post-transcriptionnelles reconnues et étudiées, il existe l'ajout d'un groupe méthyle à l'hydroxyle 2' d'un résidu du ribose d'un nucléoside. Cette modification est appelée 2'-O-Méthylation (2'-O-Me). L'une des particularités intéressantes de cette méthylation est qu'elle protège les liaisons phosphodiester adjacentes d'une dégradation alcaline. En faisant usage de cette caractéristique, il est possible d'établir des profils de méthylation des ARNr, puisqu'un site méthylé ne se retrouvera jamais à l'extrémité 3' ou 5' d'un des fragments obtenus suite à la dégradation (51). L'établissement d'un profil des 2'-O-Me porte le nom de RiboMethSeq. Les modifications du profil de méthylation d'un ARNr ont pu être liées à certains cancers. Par exemple, les cancers du sein peuvent être répartis dans 4 catégories, selon leur profil de méthylation ribosomale, et chacune de ces 4 catégories ont un taux de survie différent. Les trois grades de tumeurs mammaires, ainsi que les sous-types, sont également répartis différemment dans les 4 profils de méthylation (52). Dans le cas des lymphomes diffus à grandes cellules B, les profils de méthylation de certains patients ont été établis et il a été constaté une hypométhylation de plusieurs sites. De plus, la perturbation était plus sévère dans le type activé b périphérique que dans le type centro folliculaire (53). En règle générale, le niveau de méthylation de sites spécifiques des ARNr peut être comme une façon de contrôler de manière épitranscriptomique l'activité traductionnelle des ribosomes (54). C'est

pourquoi nous avons établi les profils RiboMethSeq des lignées cellulaires XPCS1RO-SV et XPCS1RO-SV+XPG-GFP, afin de découvrir si la protéine XPG était impliquée dans l'une des modifications post-transcriptionnelles majeures des ARNr.

Les 2'-O-Me sont sous la responsabilité des snoRNA, qui servent de guides pour les modifications de l'ARN-ARN dépendantes (55). Si les altérations du profil de méthylation 2'-O-Me sont principalement liées à des cancers, des modifications ont tout de même été identifiées dans d'autres syndromes : le syndrome de Prader Willi, notamment, dont les patients souffrent de retards mentaux, d'hypotonie musculaire, d'obésité ainsi que d'une taille inférieure à la moyenne. Deux snoARN boîte C/D, qui catalysent les 2'-O-Me, SNORD115 et SNORD116, ont été directement liés à ce syndrome : ils ne sont pas correctement exprimés chez les patients (56,57). Toutefois, dans notre modèle d'étude, nous n'avons établi aucune différence significative entre les scores de méthylation des sites connus, suspectés, ou même des nouveaux sites candidats à la méthylation, et ce dans les trois ARNr matures (Figure 15, Figures S4,5,6). La protéine XPG n'a donc pas de rôle dans la méthylation 2'-O-Me. Cependant, la cellule semble faire montre d'une certaine « tolérance » aux modifications des profils de méthylation : il a par exemple été démontré que dans des cellules en culture, des ribosomes méthylés de façon hétérogène peuvent coexister (58) et que des cellules avec une protéine Fibrillarine, liée à de très nombreuses 2'-O-méthylations, bloquée par utilisation d'un petit ARN interférent (siARN) pouvaient toujours produire des ribosomes matures même si jusqu'à 50% des sites 2'-O-Me n'étaient pas méthylés (59). Toutefois, comme les 2'-O-Me sont nombreux et bien caractérisés sur les ARNr matures et que nous cherchions à étudier le rôle de la protéine XPG dans la biogénèse des ribosomes, nous devons réaliser cette expérience. Si cette modification est sans doute la mieux caractérisée, on peut tout de même se demander si d'autres modifications peuvent ne pas être réalisées correctement en l'absence de la protéine XPG, par exemple les pseudouridylations.

Les modifications de la maturation des ARNr peuvent perturber la cellule de plusieurs façons : tout d'abord, parce que ceci pourrait conduire à la diminution du nombre de ribosomes matures, et que ceci affecterait l'activité traductionnelle globale de la cellule. Comme évoqué plus haut, la technique du polysome profiling nous permettrait d'observer les ribosomes matures dans nos différentes lignées cellulaires. Dans notre cas de figure, nous avons pu mesurer l'activité traductionnelle des ribosomes, afin de « conclure » notre étude du rôle d'XPG dans la biogénèse des ribosomes en observant ce qui se passait une fois les ribosomes matures. Nous avons cherché à savoir si l'absence de la protéine XPG, qui influe à la fois sur l'activité transcriptionnelle de l'ARNPol1 mais aussi sur la maturation de l'ARNr 47S, a une conséquence sur le rôle principal des ribosomes : la traduction, c'est-à-dire la synthèse de protéines à partir de l'ARN messenger. Au cours de ce processus, les ARNt produits par l'ARN Polymérase 3 font correspondre les acides aminés au triplet nucléotidique de l'ARNm, au sein du site P du ribosome, après être entré par le site A. Tandis que les ARNt déchargés de leur acide aminé sortent de la machinerie ribosomique par le site E, les acides aminés forment des chaînes polypeptidiques dans le site A. Ces chaînes polypeptidiques subiront des changements de conformation dits secondaires et tertiaires voire quaternaires suite à leur synthèse, pour former les protéines matures. Il est possible de mesurer le niveau d'activité traductionnelle de cellules en profitant d'une caractéristique de la puromycine, un antibiotique issu de *Streptomyces Alboniger*. Cette antibiotique présente une analogie structurale avec un ARNt chargé d'un acide aminé, et lorsqu'il est utilisé en concentration suffisamment faible, il est intégré dans les ribosomes pour faire partie des polypeptides néosynthétisés (60). Il est

ensuite facile de visualiser la puromycine au moyen d'anticorps et de techniques appropriés, afin d'établir un niveau brut de l'activité traductionnelle dans des conditions particulières.

Par Western Blot, nous avons mesuré le signal Puromycine dans les lignées cellulaires MRC5-SV, XPCS1RO-SV et XPCS1RO-SV+XPG-GFP. Afin de s'assurer de la spécificité de ce signal, nos échantillons cellulaires ont été étudiés en triplicat : en plus de l'extrait cellulaire traité avec de la puromycine, nous avons utilisé des extraits cellulaires non traités, et des extraits cellulaires traités avec du cycloheximide, une drogue qui bloque la traduction, puis avec de la puromycine. Ainsi, nous avons pu mesurer un signal puromycine traduction dépendant (Figure 16C). Nous n'avons pas observé de différences significatives du niveau de traduction entre les trois lignées cellulaires, même si la tendance semblait plus haute chez les cellules XPCS1RO-SV et inversement, plus basse dans les cellules XPCS1RO-SV+XPG-GFP. Ce résultat est toutefois à mettre en perspective : certes, le signal puromycine équivalent montre une activité traductionnelle similaire, néanmoins, le SUnSET ne renseigne pas sur la qualité des protéines produites. On pourrait imaginer, en l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle, des arrêts précoces de la synthèse des chaînes polypeptidiques dus à la qualité ribosomique moindre, ou des erreurs dans la traduction qui causeraient l'accumulation de produits de traduction néfastes pour la cellule. D'autres expériences doivent être réalisées pour vérifier la qualité traductionnelle, plus que la quantité. En effet, il a récemment été démontré qu'un défaut des mécanismes de contrôle-qualité des produits de traductions pouvait être lié à des pathologies neurodéveloppementales (61). Une altération du traductome pourrait être un autre mécanisme potentiel d'explication des symptômes observés chez les patients XP-G/CS.

De plus, la modification de l'homéostasie ribosomique peut affecter le développement autrement que par l'activité traductionnelle générale en elle-même : tout d'abord, le pool de ribosomes cellulaires est extrêmement hétérogène, et l'existence de ribosomes spécialisés, qui doivent agir à certains moments du développement ou dans certains tissus, a été démontrée (62). Les changements dans la maturation des ARN ribosomiques pourraient affecter et perturber le bon fonctionnement de ces ribosomes spécialisés. Ici, dans le contexte XP-G/CS, la perturbation du développement physique et cognitif pourrait être liée à la perte/modification de la fonction de certains ribosomes spécialisés, en plus de la perturbation des autres processus évoqués ci-dessus. Enfin, malgré l'existence de contrôles qualité qui éliminent les ribosomes aberrants (63), il a été prouvé chez la levure que certains précurseurs ARNr immatures pouvaient participer à la transcription (64,65) et favorisaient la traduction de certains ARNm plutôt que d'autres (66). Ce point ajoute encore une complexité potentielle à la perturbation de la maturation des ARNr, démontrant s'il le fallait encore que l'homéostasie ribosomique est absolument essentielle au développement correct du vivant.

Pour conclure, la présence d'une protéine XPG tronquée modifie l'homéostasie de la cellule à plusieurs étapes au cours de la biogénèse des ribosomes : d'abord en modifiant l'environnement chromatinien, à savoir une augmentation du taux d'occupation de la protéine UBF sur les gènes ribosomiques, et donc une augmentation du nombre de copies actives d'ADNr et une dérégulation de la transcription qui conduit à une augmentation de l'ARNr 47S, des éléments déjà reliés précédemment à une perturbation de la neurogénèse, qui pourrait expliquer les sévères symptômes neurologiques observés chez les patients XP-G/CS. Nous avons également mesuré une augmentation de la quantité de R-loops le long des ADN ribosomiques, et cette accumulation peut avoir des conséquences dramatiques : en effet, l'accumulation de R-loops non résolus sur des loci géniques semble être une cause

majeure de nombreuses maladies neurodégénératives, et dans le contexte XP-G/CS, elle pourrait perturber encore plus un développement déjà très perturbé par la dérégulation de la production du premier précurseur des ARN ribosomiques. En plus de ces perturbations liées à la transcription, l'absence d'une protéine XPG fonctionnelle perturbe également la maturation des ARNr en causant l'accumulation de certains précurseurs. La perturbation de la maturation des ARNr peut affecter de trois façons la cellule : tout d'abord, en affectant la quantité de ribosomes matures, et donc le niveau d'activité traductionnelle de la cellule, qui n'est pas affecté par l'absence de la protéine XPG. La question reste néanmoins ouverte concernant la qualité des produits de traduction dans le contexte XP-G/CS. Toutefois, il ne faut pas exclure que le dérèglement du processus de maturation des ARNr n'affecte certains ribosomes spécialisés, aux rôles finement régulés dans la spatialité et la temporalité du bon développement cellulaire, voire que ce dérèglement ne contribue à la formation de ribosomes aberrants car immatures, qui favorisent la traduction de certains ARNm par rapport à d'autres. Enfin, nous avons établi le profil des 2'-O-méthylations sur les ARNr matures des cellules dérivées de patients XP-G/CS, méthylations qui ajoutent un niveau de contrôle épitranscriptomique à la traduction. Nous n'avons pas observé de rôle de la protéine XPG dans l'établissement de la méthylation des résidus 2'-O des riboses. Parmi les procédés observés, seule la 2'-O-Me méthylation des ARNr matures semble ne pas être perturbée par l'absence d'XPG. La perturbation de tous ces processus, en plus des défauts de la réparation par le système NER, contribueraient à expliquer la multiplicité des symptômes observés chez les patients XP-G/CS. Nous avons établi de nouveaux rôles de la protéine codée par le gène ERCC5 dans la biogénèse des ribosomes, et si des expériences restent à accomplir pour comprendre plus en détail comment cette protéine agit dans ces différents mécanismes, nous avons posé la voie pour la découverte de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles, notamment en rapprochant XP-G/CS d'autres catégories de maladie que celles dites de la réparation, par exemple les ribosomopathies.

## BIBLIOGRAPHIE :

1. Sarker AH, Tsutakawa SE, Kostek S, Ng C, Shin DS, Peris M, et al. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell*. 28 oct 2005;20(2):187-98.
2. Bessho T. Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 15 févr 1999;27(4):979-83.
3. Groh M, Gromak N. Out of Balance: R-loops in Human Disease. *PLOS Genetics*. 18 sept 2014;10(9):e1004630.
4. Bradsher J, Auriol J, Santis LP de, Iben S, Vonesch J-L, Grummt I, et al. CSB Is a Component of RNA Pol I Transcription. *Molecular Cell*. 1 oct 2002;10(4):819-29.
5. Moss T, Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T. A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. *Biochem Soc Trans*. déc 2006;34(Pt 6):1079-81.
6. Cerqueira AV, Lemos B. Ribosomal DNA and the Nucleolus as Keystones of Nuclear Architecture, Organization, and Function. *Trends Genet*. oct 2019;35(10):710-23.
7. Lindström MS, Jurada D, Bursac S, Orsolich I, Bartek J, Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*. mai 2018;37(18):2351-66.
8. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem*. 20 juin 2019;88:281-306.
9. Cui C, Tseng H. Estimation of ribosomal RNA transcription rate in situ. *BioTechniques*. janv 2004;36(1):134-8.
10. Jantzen HM, Chow AM, King DS, Tjian R. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev*. oct 1992;6(10):1950-63.
11. Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 1 janv 2007;64(1):29-49.
12. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell*. 3 mars 2006;21(5):629-39.
13. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JCBM. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J*. 26 juill 2006;25(14):3310-22.

14. Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, et al. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol.* 29 déc 2008;183(7):1259-74.
15. Nelson JO, Watase GJ, Warsinger-Pepe N, Yamashita YM. Mechanisms of rDNA Copy Number Maintenance. *Trends Genet.* oct 2019;35(10):734-42.
16. Tsutakawa SE, Sarker AH, Ng C, Arvai AS, Shin DS, Shih B, et al. Human XPG nuclease structure, assembly, and activities with insights for neurodegeneration and cancer from pathogenic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 juin 2020;117(25):14127-38.
17. Edvardson S, Nicolae CM, Agrawal PB, Mignot C, Payne K, Prasad AN, et al. Heterozygous De Novo UBTF Gain-of-Function Variant Is Associated with Neurodegeneration in Childhood. *Am J Hum Genet.* 3 août 2017;101(2):267-73.
18. Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, Shiotani B, Yamauchi M, Nakada S, et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell.* 04 2018;175(2):558-570.e11.
19. Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aguilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell.* 18 déc 2014;56(6):777-85.
20. El Hage A, French SL, Beyer AL, Tollervey D. Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev.* 15 juill 2010;24(14):1546-58.
21. Schärer OD. XPG: its products and biological roles. *Adv Exp Med Biol.* 2008;637:83-92.
22. Grunseich C, Wang IX, Watts JA, Burdick JT, Guber RD, Zhu Z, et al. Senataxin Mutation Reveals How R-Loops Promote Transcription by Blocking DNA Methylation at Gene Promoters. *Molecular Cell.* 1 févr 2018;69(3):426-437.e7.
23. Ginno PA, Lim YW, Lott PL, Korf I, Chédin F. GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res.* oct 2013;23(10):1590-600.
24. Skourti-Stathaki K, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ. R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature.* 18 déc 2014;516(7531):436-9.
25. Reddy K, Schmidt MHM, Geist JM, Thakkar NP, Panigrahi GB, Wang Y-H, et al. Processing of double-R-loops in (CAG) $\cdot$ (CTG) and C9orf72 (GGGGCC) $\cdot$ (GGCCCC) repeats causes instability. *Nucleic Acids Research.* 15 sept 2014;42(16):10473-87.
26. Becherel OJ, Sun J, Yeo AJ, Nayler S, Fogel BL, Gao F, et al. A new model to study neurodegeneration in ataxia oculomotor apraxia type 2. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2015;24(20):5759-74.

27. García-Rubio ML, Pérez-Calero C, Barroso SI, Tumini E, Herrera-Moyano E, Rosado IV, et al. The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genet.* nov 2015;11(11):e1005674.
28. Schwab RA, Nieminuszczy J, Shah F, Langton J, Lopez Martinez D, Liang C-C, et al. The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. *Mol Cell.* 5 nov 2015;60(3):351-61.
29. Sondalle SB, Longerich S, Ogawa LM, Sung P, Baserga SJ. Fanconi anemia protein FANCI functions in ribosome biogenesis. *PNAS.* 12 févr 2019;116(7):2561-70.
30. Chirnomas SD, Kupfer GM. The inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatr Clin North Am.* déc 2013;60(6):1291-310.
31. Parikh S, Bessler M. Recent insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Curr Opin Pediatr.* févr 2012;24(1):23-32.
32. Abraham KJ, Khosraviani N, Chan JNY, Gorthi A, Samman A, Zhao DY, et al. Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. *Nature.* sept 2020;585(7824):298-302.
33. Paolini NA, Attwood M, Sondalle SB, Vieira CM dos S, Adrichem AM van, Summa FM di, et al. A Ribosomopathy Reveals Decoding Defective Ribosomes Driving Human Dysmorphism. *The American Journal of Human Genetics.* 2 mars 2017;100(3):506-22.
34. Wang M, Pestov DG. Quantitative Northern Blot Analysis of Mammalian rRNA Processing. *Methods Mol Biol.* 2016;1455:147-57.
35. Aubert M, O'Donohue M-F, Lebaron S, Gleizes P-E. Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases. *Biomolecules.* 24 oct 2018;8(4):123.
36. Henras A, Plisson-Chastang C, O'Donohue M-F, Chakraborty A, Gleizes P-E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* 1 oct 2014;6.
37. Stevens A. Endonucleolytic cleavage of RNA at 5' endogenous stem structures by human flap endonuclease 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 oct 1998;251(2):501-8.
38. Morales J, Richard P, Patidar P, Motea E, Dang T, Manely J, et al. XRN2 Links Transcription Termination to DNA Damage and Replication Stress. *PLoS Genetics.* 20 juill 2016;12.
39. Narita T, Narita K, Takedachi A, Saijo M, Tanaka K. Regulation of Transcription Elongation by the XPG-TFIIH Complex Is Implicated in Cockayne Syndrome. *Mol Cell Biol.* 15 sept 2015;35(18):3178-88.
40. Eaton JD, Davidson L, Bauer DLV, Natsume T, Kanemaki MT, West S. Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity. *Genes Dev.* 15 janv 2018;32(2):127-39.

41. Dang TT, Morales JC. XRN2 Links RNA:DNA Hybrid Resolution to Double Strand Break Repair Pathway Choice. *Cancers (Basel)*. 7 juill 2020;12(7):E1821.
42. Trego KS, Groesser T, Davalos AR, Parplys AC, Zhao W, Nelson MR, et al. Non-catalytic Roles for XPG with BRCA1 and BRCA2 in Homologous Recombination and Genome Stability. *Mol Cell*. 18 févr 2016;61(4):535-46.
43. El Hage A, Koper M, Kufel J, Tollervey D. Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev*. 15 avr 2008;22(8):1069-81.
44. Wang M, Pestov DG. 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Res*. mars 2011;39(5):1811-22.
45. Yoshikawa H, Ishikawa H, Izumikawa K, Miura Y, Hayano T, Isobe T, et al. Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res*. 23 juin 2015;43(11):5524-36.
46. Montellese C, Montel-Lehry N, Henras AK, Kutay U, Gleizes P-E, O'Donohue M-F. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res*. 20 juin 2017;45(11):6822-36.
47. Preti M, O'Donohue M-F, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaillé M-L, Choesmel V, Gleizes P-E. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res*. avr 2013;41(8):4709-23.
48. Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJM, Watkins NJ. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol*. 4 mars 2013;200(5):577-88.
49. Uringa E-J, Baldeyron C, Odijk H, Wassenaar E, van Cappellen WA, Maas A, et al. A mRad51-GFP antimorphic allele affects homologous recombination and DNA damage sensitivity. *DNA Repair (Amst)*. janv 2015;25:27-40.
50. Natchiar SK, Myasnikov AG, Kratzat H, Hazemann I, Klaholz BP. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature*. 23 nov 2017;551(7681):472-7.
51. Marchand V, Blanloeil-Oillo F, Helm M, Motorin Y. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Res*. 19 sept 2016;44(16):e135.
52. Marcel V, Kielbassa J, Marchand V, Natchiar KS, Paraqindes H, Nguyen Van Long F, et al. Ribosomal RNA 2'-O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer*. déc 2020;2(4):zcaa036.

53. Krogh N, Asmar F, Côme C, Munch-Petersen HF, Grønbaek K, Nielsen H. Profiling of ribose methylations in ribosomal RNA from diffuse large B-cell lymphoma patients for evaluation of ribosomes as drug targets. *NAR Cancer*. déc 2020;2(4):zcaa035.
54. Monaco PL, Marcel V, Diaz J-J, Catez F. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules*. 3 oct 2018;8(4):106.
55. Deogharia M, Majumder M. Guide snoRNAs: Drivers or Passengers in Human Disease? *Biology (Basel)*. 20 déc 2018;8(1):1.
56. Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science*. 13 janv 2006;311(5758):230-2.
57. Bortolin-Cavaillé M-L, Cavaillé J. The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res*. août 2012;40(14):6800-7.
58. Krogh N, Jansson MD, Häfner SJ, Tehler D, Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, et al. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res*. 19 sept 2016;44(16):7884-95.
59. Eralles J, Marchand V, Panthu B, Gillot S, Belin S, Ghayad SE, et al. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *PNAS*. 5 déc 2017;114(49):12934-9.
60. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*. avr 2009;6(4):275-7.
61. Terrey M, Adamson SI, Chuang JH, Ackerman SL. Defects in translation-dependent quality control pathways lead to convergent molecular and neurodevelopmental pathology. *eLife*. 26 avr 2021;10:e66904.
62. Genuth NR, Barna M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell*. 2 août 2018;71(3):364-74.
63. Lykke-Andersen J, Bennett EJ. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J Cell Biol*. 17 févr 2014;204(4):467-76.
64. Soudet J, Gélugne J-P, Belhabich-Baumas K, Caizergues-Ferrer M, Mougin A. Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 6 janv 2010;29(1):80-92.
65. Rodríguez-Galán O, García-Gómez JJ, Kressler D, de la Cruz J. Immature large ribosomal subunits containing the 7S pre-rRNA can engage in translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol*. 7 juill 2015;12(8):838-46.
66. Ferretti MB, Ghalei H, Ward EA, Potts EL, Karbstein K. Rps26 directs mRNA-specific translation by recognition of Kozak sequence elements. *Nat Struct Mol Biol*. sept 2017;24(9):700-7.

## CONCLUSION :

L'objectif de ma thèse était de répondre aux questions suivantes : la protéine XPG est-elle impliquée dans la biogénèse des ribosomes ? Le cas échéant, quel(s) rôle(s) y joue-t-elle ? Et, par extension, peut-on exploiter ces rôles pour établir de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients affectés par cette maladie ? Il apparaît clair que la protéine XPG joue de nombreux rôles à diverses étapes de la production des ribosomes : tout d'abord, elle permet de réduire la quantité d'ARNr 47S produit. Elle permet également la réduction du stress transcriptionnel en dégradant les R-loops qui s'accumulent en amont de l'ARN Pol 1. Enfin, elle est nécessaire pour la maturation correcte des ARN ribosomiques. Si d'autres travaux restent nécessaires afin d'étudier plus en détail ses rôles dans ces trois processus, nous avons néanmoins posé les jalons dans des domaines nouveaux, où la protéine XPG n'était pas forcément attendue. Par extension, ces domaines permettront peut-être de rapprocher XP-G/Cs d'autres maladies, certes également rares, comme les ribosomopathies, mais ceci contribuera à la multiplicité des pistes pour le traitement de cette pathologie rare.

S'il s'est concentré uniquement sur un modèle cellulaire, ce travail a néanmoins contribué à montrer que les maladies dites de la réparation sont parfois plus complexes que leur nom ne l'indique : en effet, dans notre cas, ce n'est pas seulement la réparation par le NER qui est déficiente, mais l'une des activités les plus coûteuses métaboliquement de la cellule. Ceci met en lumière les multiples rôles des protéines dites de la réparation, et le besoin capital de comprendre le fonctionnement de ces protéines afin de découvrir les raisons derrière le phénotype de certains syndromes complexes et éventuellement de trouver un traitement, mélioratif à défaut de curatif, pour les patients affectés par ces syndromes. Le chemin est encore long, mais les bases sont posées. A l'échelle plus globale, étudier les rôles d'autres protéines dans des processus non-directement liés à la réparation pourrait permettre des découvertes majeures dans le domaine des maladies rares.