



Le protéasome et le fer: rôles et/ou régulations dans le nucléole d'Arabidopsis thaliana

Charlotte Montacié

► To cite this version:

Charlotte Montacié. Le protéasome et le fer: rôles et/ou régulations dans le nucléole d'Arabidopsis thaliana. Biologie végétale. Université de Perpignan, 2019. Français. NNT : 2019PERP0002 . tel-02145634

HAL Id: tel-02145634

<https://theses.hal.science/tel-02145634>

Submitted on 3 Jun 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par

UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
« Énergie Environnement » ED 305

Et de l'unité de recherche LGDP-UMR 5096 CNRS-UPVD

Spécialité : Biologie

Présentée par Charlotte Montacié

**Le protéasome et le fer :
Rôles et/ou régulations dans le nucléole
*d'Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 26 Février 2019 devant le jury composé de

M. Martin CRESPI, Directeur de laboratoire,
CNRS - Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette

Rapporteur

M. Pierre-Emmanuel GLEIZES, Professeur,
Université Paul Sabatier, Toulouse

Rapporteur

M. Todd BLEVINS, Chargé de Recherche,
UPR 2357-CNRS, Strasbourg

Examinateur

M. Stéphane MARI, Directeur de Recherche,
UMR 5004 CNRS-SupAgro INRA, Montpellier

Examinateur

M. Jean-Philippe REICHHELD, Directeur de Recherche,
UMR 5096 CNRS-UPVD, Perpignan

Examinateur

M. Julio SÁEZ-VÁSQUEZ, Directeur de Recherche,
UMR 5096 CNRS-UPVD, Perpignan

Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, pour les remarques constructives apportées et leur présence lors de ma soutenance de thèse. Merci également aux membres du comité de suivi de thèse pour l'évaluation et leurs conseils sur mes travaux de recherche.

Je remercie l'UPVD, l'école doctorale, par qui j'ai obtenu ma bourse de thèse pour trois ans, et pour les formations transversales dispensées.

Je remercie également Jean-Marc Deragon, directeur du LGDP, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et m'avoir aidée pour mes premiers pas dans l'enseignement.

Un immense merci à Julio Sáez-Vásquez, mon directeur de thèse. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir fait confiance, déjà en Master 2. Merci d'avoir réussi à débloquer des fonds pour que je finisse cette thèse dans de bonnes conditions. Merci aussi pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, pour avoir écouté et pris en compte mes arguments et requêtes. Vous avez su être à l'écoute et m'avez toujours donné de bons conseils. Merci pour toutes les opportunités que vous m'avez offertes. Merci de m'avoir accompagnée, soutenue, encadrée et surtout supportée pendant ces 4 ans. Et merci de m'avoir aidée à surmonter toutes ces épreuves, qui m'ont permis de grandir.

Un immense merci également à Anne De Bures et à Édouard Jobet ! Vous avez été mes bras et mes jambes durant des mois entiers... Vous avez toujours été là au moindre souci et toujours dans la bonne humeur, pendant les TP ou à la paillasse.

Pascale Comella et Sophie Brando-Got, je ne vous oublie pas. Un grand merci à vous deux également pour m'avoir aidée dans le laboratoire ou dans l'enseignement. Et merci aussi pour la bonne ambiance que vous avez apporté à mon environnement de travail.

Tommy, on se connaît à peine mais je te remercie de prendre en main le projet de tri des nucléoles et séquestration des protéines nucléolaires. C'est un magnifique projet, qui grâce à toi va pouvoir se développer.

Merci à tous les membres du laboratoire LGDP. Vous avez tous contribué au bon déroulement de ma thèse à votre manière, et surtout à la bonne humeur qui l'a entourée. Merci de m'avoir accordé de votre temps pour répondre à mes interrogations, me former sur des pratiques de laboratoire, partager vos conseils et expertises ou pour les services communs.

Sébastien, merci pour ta patience quant à nos nombreuses discussions « animées » entre Julio et moi au sein du même bureau...

Frédéric, merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour toutes les discussions qu'on a partagées, tant scientifiquement que personnellement.

Sylvie, merci pour nos discussions scientifiques, personnelles et pour la relecture.

Jean-Jacques et Soizik, toujours présents à chacune de mes requêtes, merci, vous avez pris le temps de m'écouter. Vous m'avez aidée à me poser les bonnes questions.

Elisabeth, tout commença avec une convention de stage problématique... et cela a duré 4 ans de formalités administratives complexes, et jusqu'au dernier moment... Merci de ta disponibilité, patience et expertise.

Myriam et Jean-René, désolée pour les remboursements de mission ou commandes au dernier moment... aurais-je contribué à la légendaire mauvaise humeur permanente de JR ?

Odile... par où commencer ? Merci pour ton accueil et soutien permanent, tes encouragements et ta vision toujours positive des choses de la vie.

Nathalie, tu as quitté le laboratoire avant que je ne débute cette thèse, mais c'est toi qui as accompagné mes premiers pas pendant mon stage de Master 2. Tu as été un modèle pour moi et une amie aussi. Je te souhaite une belle place dans la recherche après ton post-doc !

Clarisse, malheureusement nos routes se sont séparées. Ne renonce pas, j'espère que tu auras une belle opportunité, je sais de quoi tu es capable ! J'ai passé de supers moments avec toi, merci.

Laura, on se connaît depuis le Master à Montpellier. Je suis vraiment très heureuse que l'on ait fait ce bout de parcours ensemble. D'abord le stress des partiels et celui du concours de l'école doctorale. Puis il y a eu l'UPVDoc..., et ta soutenance... Docteur, tu es une championne (même en laser run !).

Alheli, Ariadna, Abraham, Salvatore, j'ai été tellement heureuse de vous rencontrer ! Tous ces moments de joie, de peine, de rigolades ! « Es la banda » ... Je vous adore les amis, ne changez rien, vous êtes géniaux ! Et j'espère que l'on continuera de se voir après cette étape, en France ou ailleurs.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants et encadrants de stage que j'ai pu avoir (de la maternelle au Master) et qui m'ont soutenue, car c'est aussi grâce à eux que je peux prétendre au grade de Docteur aujourd'hui.

Merci à ma famille, qui même de loin m'a écoutée et m'a encouragée. Merci à mes amis, qui m'ont permis de décompresser et de me dépasser.

Merci à mon compagnon, qui ces derniers mois a vraiment été un homme parfait (et qui l'a toujours été), me supportant surtout depuis la rédaction de ce manuscrit !

Vous n'imaginez pas à quel point je suis heureuse d'écrire enfin ces pages de remerciements. En effet, elles sont les preuves de l'achèvement d'un travail long et fastidieux, mais passionnant qu'il me tardait quand même de finir...

Par-dessus tout, je tiens à dire merci à une personne qui a énormément compté dans ma vie. Cet amour de la découverte du monde, des quarks à l'univers, en passant par l'histoire, la langue française, le voyage et bien d'autres, c'est toi qui me l'as donné. Qui me l'as enseigné... Tu as été mon pilier, je ne sais combien de fois tu m'as rassurée... Je te dois tant de choses que si je devais les lister, j'aurais matière à en faire une deuxième thèse !

Tu m'as accompagnée (presque) jusqu'ici, mais tu ne peux malheureusement pas être là aujourd'hui, et c'est mon plus grand regret... J'avais encore tellement à apprendre de toi. Mais j'espère que de quelque part tu peux voir ce que j'ai accompli. C'est pour cela que je te dédie cette thèse, Papi. Tu resteras toujours dans mon cœur et dans mon esprit comme un grand idéal.

À mon défunt grand-père, M. Bernard MARAIS,
Professeur à l'Université de Paul Sabatier, Toulouse
Et grand père formidable...

Sommaire

PRÉFACE	1
INTRODUCTION	5
Le Nucléole	7
Historique	7
Structures du Nucléole	8
Les structures liées à la biogenèse des ribosomes	8
Les autres structures du nucléole	10
Les structures s'associant au nucléole	12
Formation et désassemblage du Nucléole	13
Texture du Nucléole	15
Les autres rôles du Nucléole	18
Le nucléole dans l'organisation chromatinienne	18
Le nucléole et le métabolisme des ARN	19
Le nucléole un senseur de stress et remobilisateur des protéines	20
Le Nucléole et les ribosomes	23
Les protéines ribosomales	24
Les ARN ribosomiques 5S	28
Les gènes d'ARN ribosomiques 45S	29
Organisation des ADNr 45S	29
Gènes actifs et inactifs	32
La transcription des ADNr 45S	34
Promoteur des ADNr	34
L'ARN Polymérase ADN dépendante I (ARNPoI) et ses facteurs de transcription	35
Mécanismes de régulation de la transcription	37
Maturation des ARNr	39
Maturation par clivage	40
Maturation par modifications chimiques	42
Biogenèse / Assemblage	44
Le complexe pré-90S	44
Les pré-sous-unités 40S et 60S	45
Sous-unité matures et assemblage du ribosome	47
OBJECTIFS	49
RÉSULTATS	53
PARTIE 1 : LE NUCLEOLE, SON PROTEOME ET LE PROTEASOME	55

Présentation du 26S Protéasome	56
Composition	56
La voie de régulation Ubiquitine / 26S Protéasome	57
Rôle de l'ubiquitine et du protéasome dans la régulation de l'expression des gènes	58
Protéasome et nucléole	59
Partie 1-1 : Article publié dans Frontiers in Plant Science	61
Partie 1-2 : Le nucléole à 37°C chez <i>A. thaliana</i>	83
L'expérimentation	83
L'analyse structurale des nucléoles	84
Le protéome nucléolaire à 37°C	86
PARTIE 2 : LE FER DANS LE NUCLEOLE	89
Le Fer dans les plantes	90
Du sol aux racines	90
Dans la plante	91
Le fer acteur dans la cellule	92
Protéines à cœur fer-soufre et biogenèse des ribosomes	94
Article en préparation	95
DISCUSSION et PERSPECTIVES	141
Le protéome nucléolaire	143
Le protéasome dans le nucléole	147
Le nucléole face au stress	150
Le fer nucléolaire et son impact sur la biogenèse des ribosomes par l'étude du mutant <i>nas1,2,4</i>	154
MATÉRIEL et MÉTHODES	159
Matériel biologique	161
Les plantes	161
Les conditions de culture	161
Méthodes relatives à l'ADN et aux ARN	163
Extraction ADN / ARN / Chromatine	163
PCR / RT-PCR	164
Traitement de l'ADN au Bisulfite et analyses	164
Immuno-précipitation de la Chromatine (ChIP)	165
Northern Blot	165
Séparation des monosomes/polysomes : Gradients de sucre	166

Méthodes relatives aux protéines	167
Extraction et Révélations	167
Tri des nucléoles : FANoS	168
Séparation noyau / cytoplasme pour les essais d'activité du protéasome	168
Extraction des protéines totales et mesure de l'activité protéasomale	169
Activité Redox	169
Méthodes de microscopie	169
DAB	169
Structure du nucléole par fluorescence	169
Structure du nucléole par microscopie électronique	170
BIBLIOGRAPHIE	171
ANNEXES	197
Annexe 1 : Article publié dans The Plant Cell	201
Annexe 2 : Article en préparation	223

Table des illustrations :

Figure 1 : Observations en microscopie électronique de nucléoles dans les années 1930-1950.	7
Figure 2 : Observation de nucléoles et de leur structure interne.	8
Figure 3 Structures internes de nucléoles spécifiques aux levures ou insectes et nucléoles tripartites, observées par microscopie électronique	9
Figure 4 : La structure du nucléole des mammifères répond aux stress (de Németh et Grummt, 2018).	11
Figure 5 : Observation des acides nucléiques et protéines contenues dans un nucléole de souris (de Politz et al., 2005)	12
Figure 6 : Schéma de l'assemblage et du désassemblage du nucléole au cours du cycle cellulaire (d'après Hernandez-Verdun et al., 2002)	14
Figure 7 : Schématisation d'un aluRNA et de son impact dans le maintien de l'intégrité du nucléole (d'après Caudron-Herger et al., 2015 et Németh et Grummt, 2018)	15
Figure 8 : Le nucléole de <i>Xenopus laevis</i> et ses composants réagissent comme des gouttelettes (d'après Brangwynne et al., 2011 et Feric et al., 2016)	16
Figure 9 : Impact des Al, Fe sur le nucléole	17
Figure 10 : Lien entre la longueur des télomères et la structure du nucléole dans le mutant Nucléoline (nuc1) chez <i>A. thaliana</i> Col-0 (d'après Pontvianne et al., 2007 et 2017)	19
Figure 11 : Régulation nucléolaire de la protéine p53 chez les mammifères (d'après Olson et Dundr, 2005 et Boulon et al., 2010)	20
Figure 12 : Régulation moléculaire de la séquestration nucléolaire des protéines chez les mammifères (de Audas et al., 2012)	21
Figure 13 : Impact de la chaleur sur la structure du nucléole (de Jacob et al., 2013)	22

Figure 14 : Biogenèse du ribosome chez les eucaryotes.	23
Figure 15 : Schéma simplifié de la régulation et de la « vie » des protéines ribosomales chez la levure (d'après Huber et Hoelz, 2017, Lempiäinen et Shore 2009 et Xiong et al 2013)	25
Figure 16 : Tableaux référençant les protéines ribosomales	26
Figure 17 : Hétérogénéité des ribosomes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en conditions de déficience en fer (Fe) ou en phosphate (Pi)	27
Figure 18 : Organisation, transcription et prise en charge des ADNr 5S chez <i>A. thaliana Columbia</i> (d'après Simon, 2016)	28
Figure 19 : Représentation schématique de l'organisation des gènes d'ARN ribosomiques 45S chez <i>A. thaliana Col-0</i>	30
Figure 20 : Observation des « Christmas tree » en microscopie électronique chez différents eucaryotes	32
Figure 21 : Schéma des séquences intergéniques de plantes, mammifères et levures (d'après Pikaard 2002 et Goodfellow et Zomerdijk, 2013)	34
Figure 22 : Schéma des complexes de transcription ARNPol I chez les mammifères et levures (d'après Grummt, 2003) et schéma putatif chez les plantes	36
Figure 23 : Complexes de modification de la chromatine des ADNr chez les mammifères (d'après Srivastava et al., 2016 et Parlato et al., 2015)	38
Figure 24 : Schéma simplifié des voies de maturation des ARNr chez les eucaryotes (d'après Choque et al., 2018, Henras et al., 2015, Tomeki et al., 2017 et Weis et al., 2015)	41
Figure 25 : Schéma des complexes snoRNP de C/D et H/ACA (de Brown et al., 2003)	43
Figure 26 : Schéma de l'assemblage du 90S Processome chez les mammifères et levures	44
Figure 27 : Schéma d'un ribosome (d'après Melnikov et al., 2012)	47
Figure 28 : Schéma du protéasome 26S (d'après Vierstra et al. 2003)	56
Figure 29 : La voie Ubiquitine / 26S protéasome	58
Figure 30 : Procédure expérimentale	83
Figure 31 : Images et analyse de nucléoles d' <i>Arabidopsis thaliana</i> au microscope confocal à épifluorescence	84
Figure 32 : Les nucléoles à 22 et 37°C n'ont pas la même texture	85
Figure 33 : Répartition des pourcentages des catégories COG dans les nucléoles à 37°C (rouge) et à 22°C (bleu)	87
Figure 34 : Deux stratégies distinctes d'absorption du fer chez les plantes (d'après Murata et al., 2015)	90
Figure 35 : Distribution du fer dans la plante	91
Figure 36 : Le fer dans la vie cellulaire (d'après Connerton et al., 2017)	93
Figure 37 : Pré-ARNr 45S d' <i>A. thaliana</i> et les sites de maturation	146
Figure 38 : Modèles de la régulation nucléolaire du protéasome et de son rôle dans la transcription et/ou la maturation des ARNr	149
Figure 39 : Modèle proposant une corrélation entre la répression du NOR2 et l'accumulation de fer dans le nucléole	156
Tableau 1 : Plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> utilisées lors de ce travail de thèse	161

Tableau 2 : Conditions de culture des plantes	162
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les différentes méthodes de ce travail de thèse	164
Tableau 4 : Composition des couches d'un gradient de 9mL allant de 15 à 60% en sucre	166
Tableau 5 : Anticorps utilisés pendant ce travail de thèse	168

PRÉFACE

Le nucléole est une entité présente dans tous les noyaux eucaryotes. Sa formation est induite par la biogénèse de ribosomes, une de ses fonctions majeures. Mais le nucléole est multifonctionnel et participe activement à de nombreux processus cellulaires, notamment grâce à sa composition protéique et chimique.

Cette thèse a pour but de montrer les liens existant entre la structure, la composition et les fonctions du nucléole chez la plante modèle *A. thaliana*.

Pour cela, je me suis appuyé sur deux cas concrets, dont les résultats sont présentés sous forme d'article publié ou en préparation, qui constituent mes deux Parties de Résultats :

1. Le nucléole, son protéome et le protéasome
2. Le fer dans le nucléole

Dans la Partie 1-1 des Résultats, je montre que la structure du nucléole et l'activité du 26S protéasome sont liées. Et dans la Partie 1-2, que la composition protéique du nucléole et sa structure changent avec l'augmentation de la température.

Enfin, des données suggèrent l'implication du fer dans la structure nucléolaire et la biogénèse du ribosome et sont présentées dans les Résultats - Partie 2.

Pour une meilleure compréhension de mon travail, une présentation du nucléole et de la biogénèse des ribosomes, fonction nécessaire à la formation du nucléole, sont présentés dans l'Introduction.

Des appports supplémentaires à la compréhension, petites introductions spécifiques au protéasome et au fer, sont placés en début de chaque Partie des Résultats.

Enfin, dans Discussion et Perspectives, les résultats sont discutés de manière globale.

Cette thèse comprend également une partie Matériel et Méthodes dans laquelle sont regroupés les éléments essentiels qui ont constitué mes analyses.

INTRODUCTION

Le Nucléole

Historique

Le nucléole est le compartiment non-membranaire le plus proéminent du noyau des cellules eucaryotes. Il fut observé pour la première fois par Fontana (1781) dans des cellules « visqueuses » épidermales d'anguille. Il le décrivit alors comme « un corps oviforme, pourvu d'une tache en son milieu ». Puis c'est en 1836 qu'il fut nommé « nucléole », signifiant un noyau dans le noyau, par Valentin.

Depuis lors, le nucléole a été l'objet de nombreuses études, et c'est dans les années 1930, avec l'arrivée des premiers microscopes électroniques, qu'un premier lien entre la formation du nucléole et la chromatine a été dévoilé (Heitz, 1931). Cette étude a permis de confirmer que la formation du nucléole suit le cycle cellulaire (observé en télophase), et de démontrer que cette formation se déroule au niveau de régions chromosomiques présentant des structures secondaires denses (« secondary constrictions »), telles que les knobs.

Quelques années plus tard, McClintock (1934) confirma ces analyses et, par l'étude de mutants de maïs, elle permit de démontrer que chacune de ces constrictions secondaires était à l'origine de la formation d'un nucléole (Figure 1A). Ainsi, elle dénomma ces régions chromosomiques les « éléments organisateurs du nucléole » (« nucleolar organizer elements »).

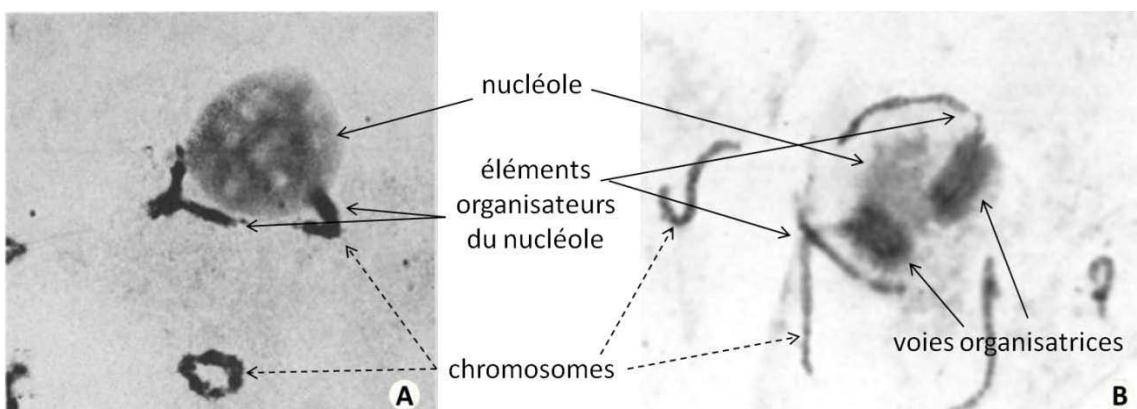


Figure 1 : Observations en microscopie électronique de nucléoles dans les années 1930-1950.

A : Observation de McClintock (1934) sur des cellules de maïs. On peut voir le nucléole associé à des chromosomes de structure dense, les éléments organisateurs du nucléole.

B : Observation de Godward (1950) sur des cellules de *Spirogyra triformis*. On peut voir les éléments organisateurs du nucléole qui se décondensent à l'intérieur du nucléole, dans les structures nommées les voies organisatrices.

Godward, en 1950, analysa des nucléoles de différentes espèces de l'algue verte *Spirogyra* durant les différentes étapes du cycle cellulaire. Il découvrit que des nucléoles, chacun formé à partir d'un élément organisateur du nucléole, pouvaient fusionner en un seul. Il a également mis en évidence la présence de structures internes du nucléole, dans lesquelles les régions chromosomiques organisatrices du nucléole (NOR) se décondensent (Figure 1B). Ces structures internes sont alors nommées « voies organisatrices » (« organizer tracks »). De

plus, que lques parties particulières de ces voies organisatrices restent associées aux éléments organisateurs durant la dissolution du nucléole (observation lors de la prophase).

Une quinzaine d'années plus tard, Brown and Gurdon (1964), ont démontré un premier lien entre la structure du nucléole et sa fonction dans la biogénèse des ribosomes lors de l'étude d'un mutant à nucléolé de *Xenopus laevis* dans lequel il n'y a pas de synthèse d'ARN ribosomiques.

En 1965, Ritossa and Spiegelman ont prouvé que dans les NOR de la mouche *Drosophila melanogaster* des séquences d'ADN complémentaires aux séquences d'ARN ribosomiques sont présentes.

Enfin, Granboulan and Granboulan en 1965 ont regardé des cellules de rein de singe, et ont montré que les ADN ribosomiques, localisés dans les NOR, sont transcrits dans les régions fibrillaires du nucléole, autrefois appelées voies organisatrices. Les ARN ribosomiques sont présents dans les régions fibrillaires et granulaires, les deux structures internes du nucléole connues alors.

Structures du Nucléole

Les structures liées à la biogénèse des ribosomes

Historiquement, seules deux structures internes au nucléole étaient connues (Figure 2) : « les voies organisatrices », aussi appelées « nucleolonema » pour leur forme réticulaire, et le « reste ». Par la suite, ont été définies des régions dites « fibrillaire » et « granulaire » (Godward, 1950; Granboulan and Granboulan, 1964, 1965; Shaw and Jordan, 1995; Stępiński, 2014).

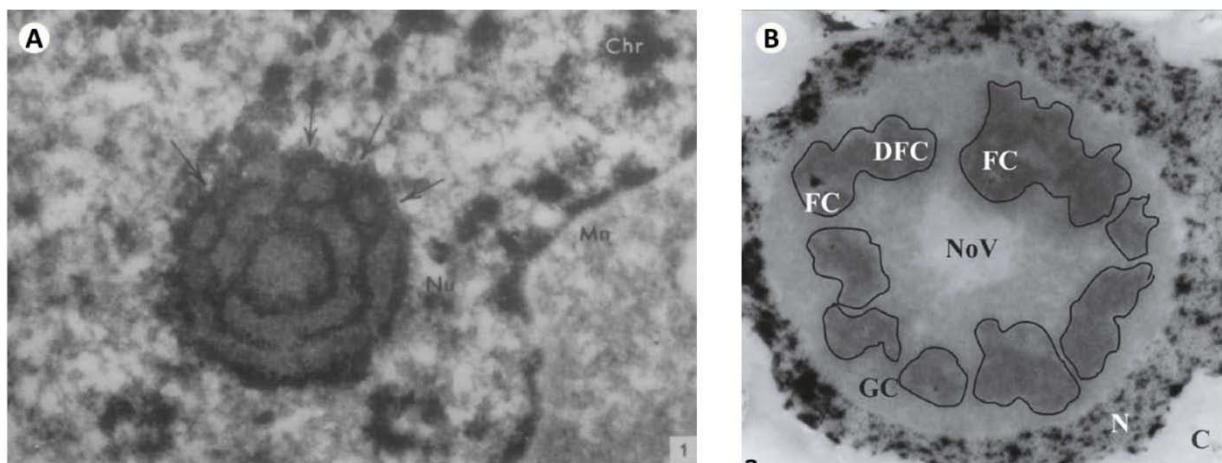


Figure 2 : Observation de nucléoles et de leur structure interne.

A : Observation de Granboulan et Granboulan (1964) dans des cellules de rein de singe. Le nucléole (Nu) comporte un « réseau de lamelles », formation réticulaire, qui débute à chaque association d'un chromosome au nucléole (flèches), c'est la « nucleolonema ». Chr : chromatine, Mn : membrane nucléaire.

B : Observation de Stępiński (2014) dans des cellules de plantes. Le nucléole végétal est composé d'une vacuole nucléolaire (NoV) et de composés FC/DFC/GC. Les entrées fibrillaires (FC) et le composé fibrillaire dense (DFC) constituent la nucleolonema (masses sombres entourées) et le reste correspond au composé granulaire. N : noyau, C : cytoplasme.

Nous savons maintenant qu'en fait, la composition, la taille et le nombre de nucléoles est très variable d'un organisme à l'autre (Montgomery, 1898; Shaw, 2015). Nous pouvons cependant faire ressortir quelques généralités, observables en Figures 3C et D : la majorité des nucléoles sont tripartites avec une région fibrillaire qui se subdivise en deux parties : les C entre

Fibrillaires (Fibrillar C enters, FC) et le C omposé F ibrillaire D ense (D ense F ibrillar Component, D FC), et enfin la r égion gr anulaire qui est app e lée le Composé G ranulaire (Granular Component, GC).

Il r este cep endant de ux grandes exceptions à cet te ré partition, les i nsectes, notamment *Drosophila melanogaster*, et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, les FC ne sont pas observés chez les insectes (Figure 3B), mais une sorte de zone fibrillaire compacte pour rait partiellement r emplacer les c entres fibrillaires (Knibiehler et al., 1984; Thiry et al., 1991). Tandis que c hez l a levure (Figure 3A), on ne di stingu que les c omposés gr anulaire e t fibrillaire, ce dernier ne pouvant pas être sous catégorisé en DFC et FC (Thiry and Lafontaine, 2005).

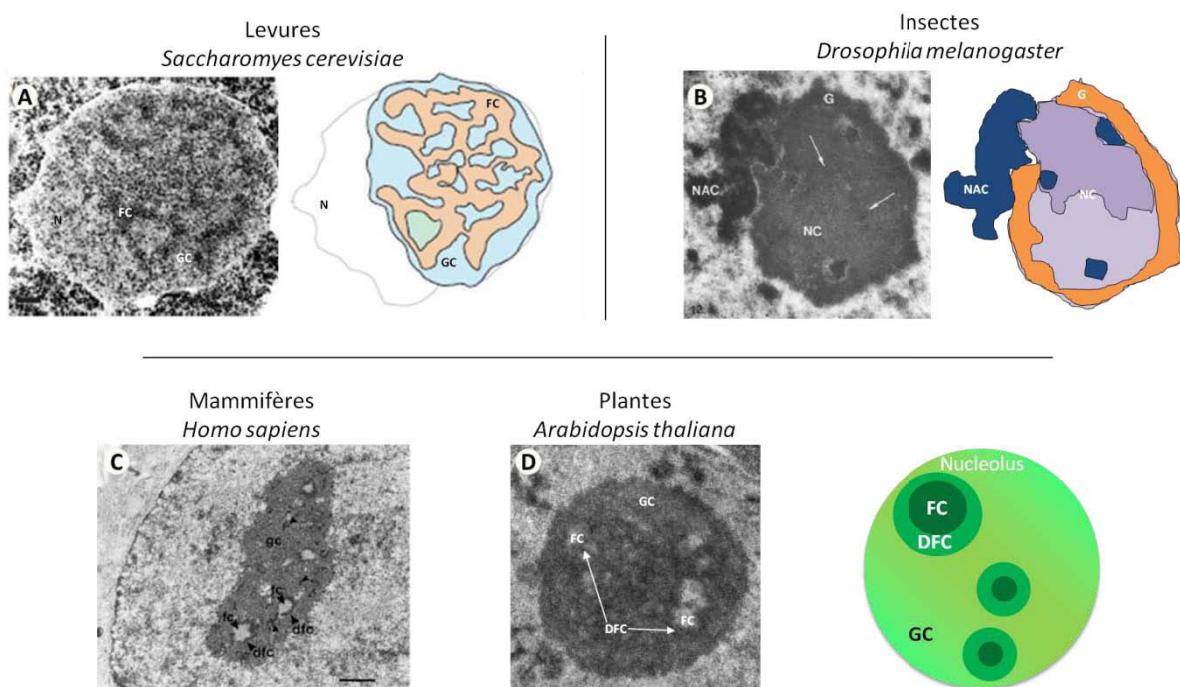


Figure 3 Structures internes de n ucléoles sp cifices aux levures ou i nsectes et n ucléoles tripartites, ob servées par microscopie lectronique

A : Observation et schématisation d'un n ucléole de levure par Thiry et Lafontaine (2005). Le n ucléole, à l'intérieur du noyau (N), est formé d'un composé granulaire (GC) et d'un composé fibrillaire (FC).

B : Observation d'un n ucléole d'insecte par Knibiehler et al. (1984), schématisé par mes soins. De l'hétérochromatine est présente à la périphérie du n ucléole (NAC pour N ucleolus A ssociated Chromatin) et à l'intérieur (bleu foncé). Le composé granulaire (G) est majoritairement retrouvé sur les bordures, tandis que le centre se nomme le corps nucléolaire (NC) que l'on peut sous-diviser en une partie fibrillaire dense (sur le haut, fléchée sur l'image et en violet sur le schéma) et une partie fibrillaire moins dense (vers le bas, en violet plus clair).

C : Observation d'un n ucléole de mammifère par Hozak et al. (1994). C'est un n ucléole tripartite contenant FC, DFC et GC.

D : Un n ucléole d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 WT, contenant les trois structures FC, DFC et GC.

À droite, un schéma d'un n ucléole tripartite de plante ou mammifère contenant les c entres fibrillaires (FC), entourés par le composé fibrillaire dense (DFC), ainsi que le composé granulaire (GC).

Dans toutes les cellules eucaryotes, la structure du nucléole dépend essentiellement de la biogénèse des ribosomes, transcription des ADNr et maturation des ARNr (Grummt, 2003; Leung and Lamond, 2003; Sáez-Vásquez and Gadal, 2010).

Les gènes d'ARN ribosomiques, localisés dans les régions Organisatrices du Nucléole (Nucleolar Organizer Region, NOR), se retrouvent décondensés à l'intérieur des centres fibrillaires et une partie de ces gènes est transcrise par l'ARN Polymérase ADN dépendante I (ARNPol I) à la périphérie FC/DFC. Par la suite, les transcrits primaires d'ARNr commencent une maturation co-transcriptionnelle dans le DFC puis sont retrouvés dans le GC sous forme de particules ribo-nucléo-protéiques, les pré-sous unités ribosomales à différentes étapes de maturation (Raška et al., 2006a ; Sáez-Vásquez and Medina, 2008; Stępiński, 2014). Les différences de structure entre les nucléoles des mammifères, plantes, levures et autres organismes eucaryotes pourraient être dues à l'évolution des gènes d'ARN ribosomiques, en particulier au niveau des séquences intergéniques. Plus précisément, l'allongement des séquences intergéniques dans l'évolution serait liée à la formation des nucléoles tripartites (Sirri et al., 2008; Thiry and Lafontaine, 2005).

De plus, le nombre et la taille des centres fibrillaires sont le reflet de « l'activité » du nucléole. En effet, un nucléole « actif » est généralement plus gros et contient plusieurs petits FC, tandis qu'un nucléole présentant une activité métabolique et transcriptionnelle réduite est plus petit avec un seul gros FC, comme observés dans des lymphocytes et des cellules neuronales de mammifères (Hozak et al., 1989; Hozák et al., 1994; Lafarga et al., 1989; Pébusque and Seite, 1981). D'ailleurs, chaque FC pourrait être la conséquence d'un nouvel événement de transcription sur des copies d'ADNr actives (Leung and Lamond, 2003). Tandis que la taille d'un centre fibrillaire serait liée à l'activité transcriptionnelle de la ARNPol I, notamment par la présence du facteur de transcription Upstream Binding Factor (voir la section – Transcription des ADNr 45S) chez les mammifères.

Les autres structures du nucléole

Une particularité des nucléoles de cellules végétales, très rarement visible chez les animaux, est la présence d'une cavité nucléolaire (Figure 2B), aussi appelée vacuole nucléolaire (NoV). Cette vacuole n'est pas toujours présente, le plus souvent observée en interfase G1 ou G2, mais est souvent associée à des nucléoles actifs. La NoV contient notamment les petits ARN nucléaires et nucléolaires (small nuclear/nucleolar RNA, snRNA/snoRNA) et des ribonucléoprotéines. Certains domaines chromatiniens s'associent à la NoV qui réalise aussi la séquestration provisoire de complexes protéiques tels que des éléments du système ubiquitine-protéasome, pour la dégradation des protéines, ou encore le complexe EJC (exon junction complex), servant à la maturation des ARN messagers (Brown and Shaw, 1998, 2008; Pendle et al., 2005; Sáez-Vásquez and Medina, 2008; Shaw, 2015; Stępiński, 2012a, 2014; Tchelidze et al., 2017). Toutefois, la fonction exacte de la NoV reste encore inconnue à ce jour.

Le nucléole peut être impliqué dans la réponse aux stress, qui vont potentiellement modifier sa structure. Par exemple, chez les mammifères en cas d'acidose ou de stress thermique, des protéines sont retenues dans les nucléoles dans une nouvelle structure appelée « centre de détention » (Figure 4). Ce centre de détention se situe au centre du nucléole, « repoussant » les FC/DFC à la périphérie du nucléole (Audas et al., 2012a; Jacob et al., 2013; Németh and Grummt, 2018). Cette partie est détaillée dans la section « Les autres rôles du nucléole – Le nucléole un senseur de stress et remobilisateur des protéines ».

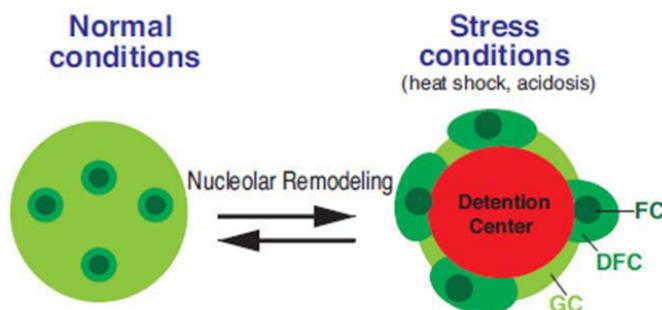


Figure 4 : La structure du nucléole des mammifères répond aux stress (de Németh et Grummt, 2018).

Lorsque le nucléole ressent un stress, de type acidose ou élévation de la température, des protéines sont séquestrées en son centre de détention (rouge), qui repousse les structures de la biogénèse des ribosomes FC/DFC et GC.

Enfin, de nombreuses riches en protéines non-associées (« libres ») à des acides nucléiques peuvent être observées dans le complexe granulaire (en bleu dans la Figure 5), en plus de particules ribonucléoprotéiques, observées en jaune (Politz et al., 2005; Raška et al., 2006a). En effet, on observe une répartition « alternée » du jaune et du bleu. Ces protéines marquées en bleu pourraient participer à la biogénèse des ribosomes (RBF, voir section Le Nucléole et les ribosomes) sans être associées aux ARNr. Mais il se peut également que ce soit de protéines ayant des fonctions extra-ribosomales. Dans ces cas, pour quoi une « alternance » entre les pré-ribosomes et ces protéines ? De part cette analyse, il est légitime de penser que le nucléole est plus compartimenté que ce qui est observé en microscopie électronique actuellement et que cette répartition peut être liée à d'autres fonctions du nucléole qui restent à découvrir.

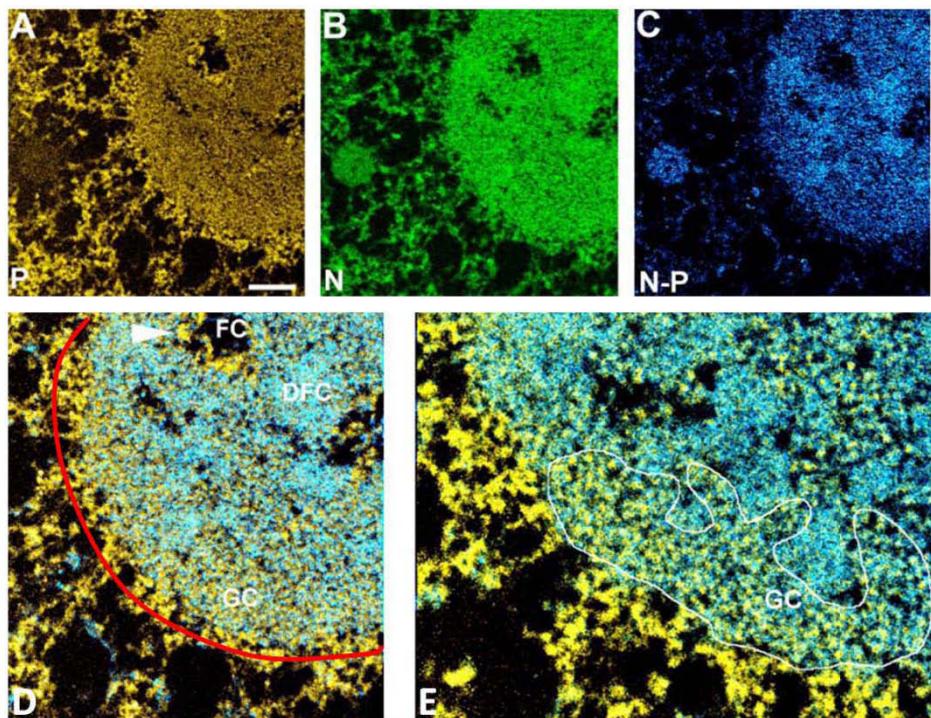


Figure 5 : Observation des acides nucléiques et protéines contenues dans un nucléole de souris (de Politz et al., 2005)
En jaune (A), on observe les acides nucléiques (ADN et ARN) par marquage du phosphate (P). En vert (B), on voit les protéines par le marquage de l'azote (N). En bleu (C), on observe les protéines non associées (« libres ») aux acides nucléiques, car les signaux P ont été soustraits aux signaux N.
D : Répartition des acides nucléiques (jaune) et protéines « libres » (bleu) dans le nucléole (délimité en rouge). Les structures internes du nucléole FC, DFC et GC sont indiquées.
E : Zoom sur le composé granulaire (GC), délimité en blanc. On dénote une alternance entre un pic bleu (protéines « libres ») et un pic jaune (acides nucléiques, sûrement les pré-ribosomes).

Les structures s'associant au nucléole

Le nucléole est connu pour être un « velcro » à hétérochromatine, majoritairement localisée à la périphérie du nucléole (Figures 1 et 3B). On y retrouve des régions répétées du génome, telles que les télomères, centromères et des copies NOR inactives, mais également quelques gènes codants pour des protéines. Ces régions de chromatine associées au nucléole ont été dénommées NAC pour Nucleolus Associated Chromatin. Les NAC et l'ADN contenu dans le nucléole sont répertoriés sous le nom de NAD pour Nucleolus Associated DNA. Ils ont été observés chez les plantes (Pontvianne et al., 2016), la levure (Padeken and Heun, 2014) et les mammifères (Németh and Längst, 2011; Padeken and Heun, 2014).

Certaines sous-structures nucléaires peuvent s'associer au nucléole, généralement en fonction de l'activité transcriptionnelle du nucléole. À notre connaissance, le corps « SAM68 » et le compartiment périnucléolaire (perinucleolar compartment, PNC), tous deux impliqués dans le métabolisme des ARN, s'associent au nucléole lorsqu'il est actif (Huang, 2000; Leung and Lamond, 2003; Pollock and Huang, 2010). À l'inverse, les corps de Cajal (Cajal bodies) et les « paraspeckles », également impliqués dans le métabolisme des ARN, snRNA et snoRNA, se lient au nucléole lorsqu'il est transcriptionnellement inactif (Fox et al., 2002; Huang, 2000; Leung and Lamond, 2003).

Cependant les chercheurs, échanges et fonctions de ces associations entre ces sous -structures nucléaires avec le nucléole n'ont pas tout à fait clairs et nécessitent de nouvelles investigations.

Chez les plantes, nous ne savons pas si il existe des paraspéckles, le PNC ou le complexe SAM68. Mais des corps de Cajal ont été observés (Brown et al., 2003).

Formation et désassemblage du Nucléole

La formation et la dissociation du nucléole suivent le cycle cellulaire, lié à l'expression des gènes. C'est en 1898, par Montgomery, que ce cycle d'assemblage/désassemblage du nucléole fut observé en suivant le cycle cellulaire. A cette époque, le nucléole est clairement perçu lors de la télophase et sa dissolution est observée dans les autres phases de la mitose : prophase, métaphase et anaphase.

Pendant toute l'interphase, le nucléole est actif, c'est-à-dire que les ADN ribosomiques, situés dans les centres fibrillaires (FC), sont transcrits par l'ARNPol I, à la périphérie FC/DFC, puis maturés, d'abord dans le DFC puis dans le composé granulaire.

En revanche lors de la mitose, on observe un désassemblage progressif du nucléole (Figure 6, d'après Hernandez-Verdun et al., 2002).

Lors de la dissociation du nucléole, ce sont d'abord les éléments servant à la maturation des ARN qui se désassemblent en tout début de prophase avant que la transcription par l'ARNPol I ne s'arrête. Cet arrêt est rendu possible par la phosphorylation des protéines incluses dans les complexes de maturation, comme la Nucléophosmine (NPM) et les facteurs de transcription de l'ARNPol I, TTF-1 (transcription termination factor 1) et SL1 (selectivity factor protein complex 1) par exemple (voir section – La transcription des ADNr 45S), par la Cdk1-cyclin B kinase. La phosphorylation de ces protéines occasionne une perte d'affinité pour leur ligation à l'ARN et/ou ADN, ce qui entraîne leur dissociation du nucléole.

En fin d'anaphase, début de télophase, les phosphatases PP1 et PP2A inhibent l'activité de la Cdk1-cyclin B kinase. Elles permettent ainsi la déphosphorylation des facteurs de transcription de l'ARNPol I et celle des protéines liées à la maturation des ARN ribosomiques, afin de rétablir ces processus et reformer un nucléole.

Pourtant, la seule transcription des ARNr ne peut conduire à la reformation d'un nucléole. Cela nécessite la présence de précurseurs d'ARNr créés lors du cycle précédent et la présence de protéines ribosomales et snoRNA, nécessaires à la maturation des ARNr. Ces éléments vont alors s'assembler en corps pré-nucléolaires (prenucleolar bodies, PNB) autour des NOR (Hernandez-Verdun, 2011; Leung and Lamond, 2003; Sirri et al., 2008).

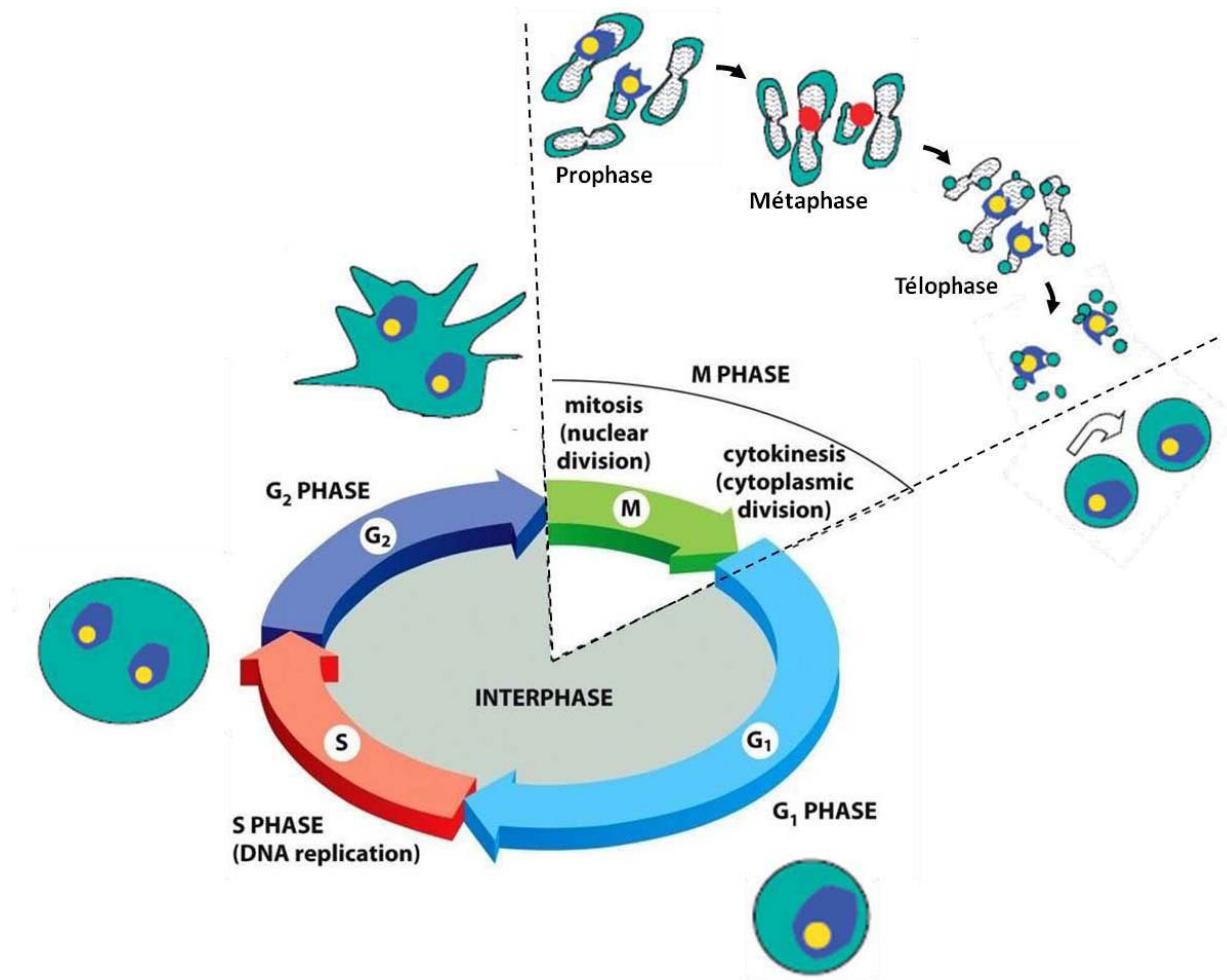


Figure 6 : Schéma de l'assemblage et du désassemblage du nucléole au cours du cycle cellulaire (d'après Hernandez-Verdun et al., 2002)

Le nucléole est initialement formé et stable ; contenant les gènes actifs d'ARN ribosomiques (au niveau de structures fibrillaires, jaunes), les premiers transcrits et leurs éléments de maturation précoce (dans le composé fibrillaire dense, bleu) et les éléments de maturation tardifs des ARN ribosomiques (composé granulaire, en vert calypso) s'observent pendant toute l'interphase. Durant la mitose, les gènes se condensent pour atteindre leur maximum de compaction en métaphase, ils ne peuvent donc plus être transcrits (points rouges). La transcription des ADNr par l'ARNPol I est réactivée durant la télophase, en même temps que le rassemblement des éléments de maturation tardifs en « corps prénucléolaires » (« prenucleolar bodies – PNB », points vert calypso) autour des chromosomes.

Néanmoins chez l'homme, il a été prouvé que seule l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de l'ARNPol II induit une dispersion du nucléole (Figure 7), c'est-à-dire qu'il est sous la forme de petits morceaux dans le noyau, l'inhibition des ARNPol I ou III n'ayant pas montré ce phénotype. En effet, des petits ARN, nommés *aluRNA*, sont transcrits par l'ARNPol II et sont nécessaires au maintien du nucléole en une structure unie. De plus, ces *aluRNA* interagissent avec la nucléoline (NUC), une protéine impliquée dans la transcription et la maturation des ARNr, majoritaire au sein du nucléole, et la Nucléophosmine (Caudron-Herger et al., 2015, 2016; Németh and Grummt, 2018; Pontvianne et al., 2007).

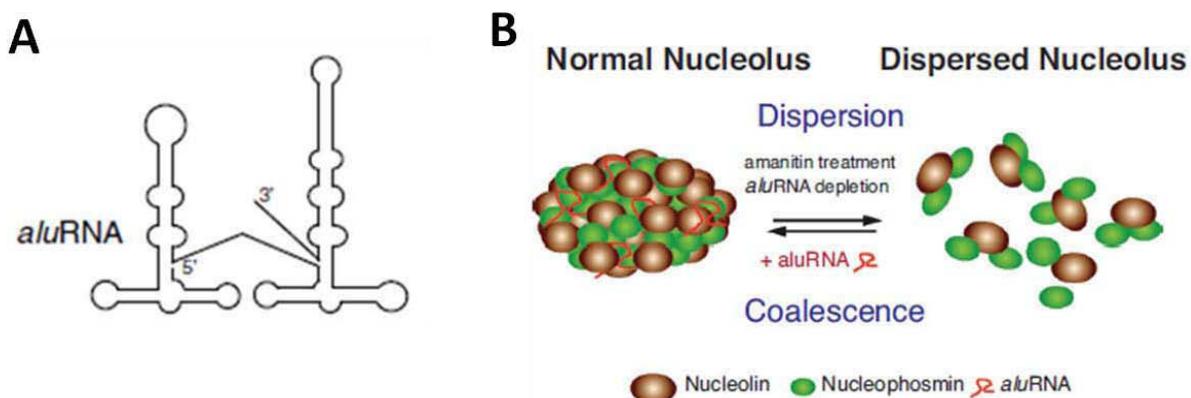


Figure 7 : Schématisation d'un *aluRNA* et de son impact dans le maintien de l'intégrité d'un nucléole (d'après Caudron-Herger et al., 2015 et Németh et Grummt, 2018)

A : Schématisation de la structure d'un *aluRNA*.

B : Les *aluRNA* sont nécessaires au maintien d'un nucléole, si elles ne sont pas disponibles, le nucléole se disperse en petits éléments. Si les *aluRNA* sont réintégrées, elles interagissent avec la nucléoline et la nucléophosmine et les petites particules fusionnent, coalescent, pour reformer le nucléole.

Texture du Nucléole

Le nucléole est très dynamique, d'ailleurs sa « structure physique » paraît très malléable. En effet, on peut observer la fusion de plusieurs nucléoles pour n'en former qu'un, plus conséquent et unique (Godward, 1950). De plus dans des embryons de *C. elegans*, la taille du nucléole est proportionnelle à celle des cellules, mais elle devient inversement proportionnelle, des nucléoles plus gros dans des cellules plus petites et inversement, lorsque la taille de l'embryon elle-même est affectée (Weber and Brangwynne, 2015). Aussi, une « suractivité » de l'ARNPol I induit une hypertrophie du nucléole, comme dans les cellules cancéreuses (Bailey et al., 1976; Cooper, 2000; Derenzini et al., 2009; Ma et al., 2016).

Cette plasticité du nucléole pourrait être expliquée par une étude réalisée sur des oocytes de Xénopé, démontrant que les nucléoles présentent un aspect visqueux *in vivo*, formant des sortes de « gouttes » d'ARN et de protéines (Figure 8A et B); et confirme de précédentes observations de nucléoles entrant en contact et fusionnant en un seul (Brangwynne et al., 2011).

Plus précisément, chaque compartiment à l'intérieur du nucléole (FC, DFC et GC) présente cet aspect de gouttelettes (Figure 8B et C), qui cette fois sont non miscibles les unes avec les autres. Ceci, à cause de leurs propriétés physico-chimiques, notamment hydrophiles ou hydrophobes, qui sont fonction du contenu en ARN et protéines de chaque compartiment (Feric et al., 2016).

Ces propriétés physiques des nucléoles peuvent éventuellement expliquer et déterminer les structures du nucléole ainsi que leur taille (Brangwynne et al., 2011; Feric et al., 2016). De plus, ces observations sont étayées par les études sur les *aluRNA*, qui interagissent avec la nucléoline, la fibrillarine et la nucléophosmine, des protéines impliquées dans la transcription et la maturation des ARNr (Németh and Grummt, 2018).

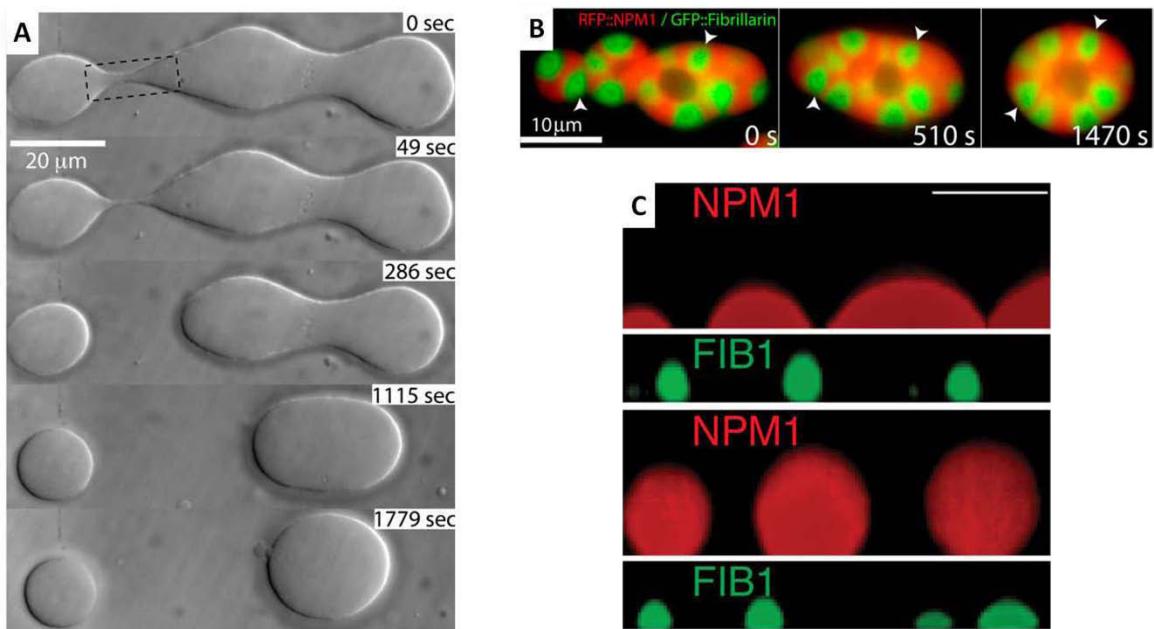


Figure 8 : Les nucléoles de *Xenopus laevis* et ses composants réagissent comme des gouttelettes (d'après Brangwynne et al., 2011 et Feric et al., 2016)

A : Séries de photographies de trois nucléoles isolés en contact (de Brangwynne et al., 2011). Le nucléole de gauche se sépare du central qui lui s'associe à celui de droite. Sur ces images on voit bien que les nucléoles réagissent comme des gouttes de liquide.

B : Marquage des protéines nucléolaires pendant la fusion de deux nucléoles (de Brangwynne et al., 2011). Les deux nucléoles fusionnent en un seul, mais les composants du nucléole, le composé granulaire, marqué par la NPM1 (la nucléophosmine en rouge), et le composé fibrillaire dense (marqué par la fibrillarine, FIB1 en vert) ne se mélangent pas entre eux.

C : Gouttelettes de fibrillarine et de nucléophosmine sur surface hydrophile ou hydrophobe (de Feric, 2016). Sur les deux images du haut, les protéines sont mises en contact avec une surface hydrophile, sur les deux du bas la surface est hydrophobe. La nucléophosmine est hydrophile alors que la fibrillarine est hydrophobe.

D'un autre côté, le nucléole contient également d'autres éléments chimiques, tels que les ions métalliques, pouvant impacter la structure du nucléole. Par exemple, l'excès d'aluminium chez *Pinus massoniana* (une espèce de pin) induit une hypertrophie des nucléoles et une surexpression de protéines nucléolines, fibrillarine et nucléophosmine, qui sont alors relocalisées vers le cytoplasme (Figure 9 A-E). Il faut également noter, que ces protéines ont la capacité de se lier à l'argent, elles sont dites argyrophiles et ont été dénommées les Ag-NOR (Pébusque and Seite, 1981; Zhang et al., 2014).

Le fer peut également impacter le nucléole et la biogénèse des ribosomes, comme démontré dans des nucléoles de cellules neuronales humaines (Figure 9 F-H). En effet, les cellules de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer présentent un excès de fer dans leurs noyaux, causant des dommages sur l'ADN, induisant une hyperméthylation des promoteurs des gènes d'ARN ribosomiques et provoquant l'oxydation des ARN ribosomiques en se liant à eux (Henle et al., 1996, 1999; Honda et al., 2005; Pietrzak et al., 2011; Quintana et al., 2006).

À contrario, une forte accumulation du fer est observée dans les nucléoles de plantes (Figure 9 I-K, chez le pois, la tomate et *A. thaliana*) ayant poussé dans des conditions normales de

croissance (Roschzttardtz et al., 2011). Une introduction spécifique sur le métabolisme du fer chez les plantes est présentée dans les Résultats Partie 2.

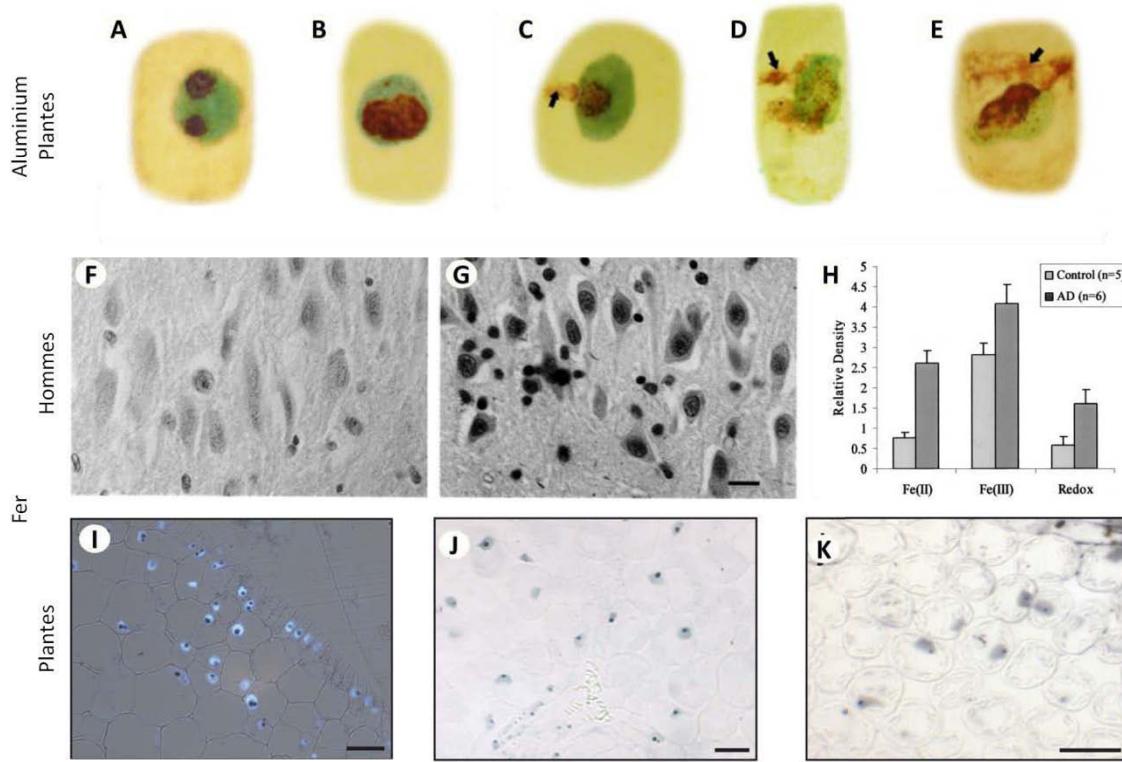


Figure 9 : Impact des Al, Fe sur le nucléole

A-E : Impact de l'excès d'aluminium sur des cellules de pin (*Pinus massoniana*), par Zhang et al., 2014. Le noyau est marqué en bleu (DAPI) et les protéines Ag-NOR (protéines argyrophiles ayant un rôle dans la biogénèse des ribosomes, comme la nucléoline, la nucléophosmine ou la fibrillarine) en rouge (aussi fléchées). **A-** Une cellule sans traitement d'aluminium est montrée en contrôle. Les cellules suivantes sont soumises à un excès d'aluminium sur un temps allant de 2 à 3 jours. **B-** avec 10^{-5} M Al pendant 72h, on observe une hypertrophie du nucléole. **C-** 10^{-4} M Al pendant 48h. **D et E-** 10^{-4} M Al pendant 72h, dans lesquels on observe également une accumulation des Ag-NOR, qui sortent du nucléole pour s'accumuler dans le noyau et dans le cytoplasme.

F-H : Impact de l'excès de fer sur des cellules neuronales humaines et sur les ribosomes dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Honda et al., 2005). **F-** marquage du Fe^{2+} des cellules neuronales d'un patient sain. **G-** marquage du Fe^{2+} des cellules neuronales d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. On remarque que le fer est plus accumulé dans les cellules de patients malades. **H-** des ribosomes ont été purifiés chez des patients sains (control) et des patients atteints d'Alzheimer (AD). Les quantités relatives d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} associés aux ribosomes ont été mesurées, ainsi que l'activité redox relative des ces ions. Chez les personnes AD, on retrouve plus d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , coïncidant avec une augmentation de l'activité redox dans les ribosomes des patients malades.

I-K : Accumulation du fer dans des nucréoles de plantes en conditions de croissance normales (Roschzttardtz et al., 2011). **I-** des cellules embryonnaires de pois ont été marquées au DAPI, pour observer le noyau, et au Perl/DAB, pour localiser le fer. On observe une localisation du fer au niveau des nucréoles. **J-** cellules du mésophile d'*A. thaliana* et **K-** cellules du mésophile de la tomate ont été marquées au Perl/DAB. On observe également une localisation du fer dans le nucréole majoritairement.

Les autres rôles du Nucléole

Le nucléole dans l'organisation chromatinienne

Puisque le nucléole est un « velcro » à héterochromatine (Figures 1 et 3B), des séquences telles que les télomères, des éléments transposables, ou des gènes très fortement réprimés, impliqués dans la réponse aux stress ou dans le développement, peuvent se retrouver associer à la périphérie du nucléole, les NAC. De même, les gènes transcriptionnellement inactifs d'ADNr 45S sont localisés à la périphérie du nucléole car ils sont en quelque sorte « exclus » de celui-ci, mais toujours rattachés. Certaines séquences d'ADN sont retrouvées à l'intérieur du nucléole et constituent, avec les NAC, les NAD (Németh and Längst, 2011; Padeken and Heun, 2014; Pontvianne et al., 2016).

Le nucléole est également impliqué dans la protection du génome (voir paragraphe sur la sénescence). En effet, il est lié aux mécanismes de déposition de séquences télomériques sur les extrémités des chromosomes pour prévenir leur dégradation (Pontvianne et al., 2016 ; Sinclair et al., 1997).

Chez les eucaryotes, à chaque réPLICATION de l'ADN les extrémités des chromosomes ne sont pas ré-synthétisées par le mécanisme de réPLICATION. Ainsi ils se raccourcissent à chaque nouveau cycle, pouvant donc engendrer des dommages aux gènes voire leur perte. De plus, les extrémités des chromosomes sont enrichies en séquences télomériques, un raccourcissement de ces séquences induit un vieillissement cellulaire (Johnson et al., 1998).

Pour pallier ce phénomène, le complexe TR/TERT (RNA Telomerase / TElomerase Reverse Transcriptase) vient ajouter des séquences répétées télomériques « TTAGGG ». Le complexe TR est localisé dans des petites granules nucléaires tandis que le complexe TERT se trouve dans les Cajal bodies. Lors de la réPLICATION de l'ADN, ces compartiments nucléolaires s'associent au nucléole pour favoriser l'assemblage de TR et TERT (Jády et al., 2004; Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004).

Par ailleurs, de nombreuses études démontrent l'existence d'un lien entre les télomères et le nucléole. Par exemple le nucléole joue un rôle dans le syndrome de Werner, une affection provoquant un vieillissement prématûRE (von Kobbe and Bohr, 2002; Marciniak et al., 1998; Szekely et al., 2000). De même, chez la levure, une désorganisation du nucléole induit un vieillissement accéléré et un raccourcissement des télomères (Sinclair et al., 1997). Chez *A. thaliana* (Figure 10), la mutation de la nucléoline entraîne une déstructuration du nucléole, un raccourcissement des télomères et induit l'expression de copies d'ADNr normalement non transcrrites (Pontvianne et al., 2007, 2016). Chez d'autres mutants comme FAS (Fasciata), les télomères sont raccourcis et l'expression des ADNr est affectée, mais la structure du nucléole reste inchangée (Pavlišová et al., 2016).

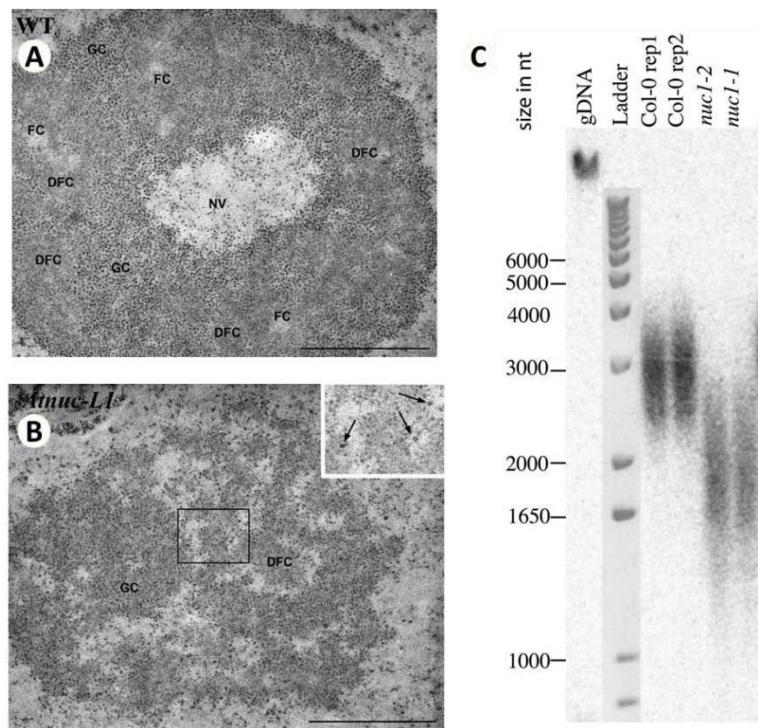


Figure 10 : Lien entre la longueur des télomères et la structure du nucléole dans le mutant Nucléoline (*nuc1*) chez *A. thaliana* Col-0 (d'après Pontvianne et al., 2007 et 2017)

A : Nucléole de plantes WT, observé en microscopie électronique par Pontvianne et al. (2007), contenant FC/DFC et GC, ainsi qu'une vacuole nucléolaire (NV).

B : Nucléole de plantes *nuc1*, observé en microscopie électronique par Pontvianne et al. (2007), qui présente une désorganisation de la structure avec de nombreux interstices. On peut néanmoins différencier le composé brillant dense (DFC) et le composé granulaire (GC). Dans l'encart en haut à droite se trouve un grossissement de la zone encadrée en noir. Dans le GC sont observées deux sortes de granules chez le mutant *nuc1*, les « standards », présentes chez le WT, et de plus grosses pointées ici par les flèches.

C : Essai réalisé par Pontvianne et al. (2017) pour déterminer la longueur des télomères chez les plantes WT (réplica) ou mutantes pour la Nucléoline sur deux loci différents de la protéine (*nuc1-1* et *nuc1-2*). Sur cette figure, on observe que les télomères des plantes WT (Col-0) font environ 3kb, tandis que ceux des mutants *nuc1* sont fortement raccourcis, ne faisant que 2kb.

Le Nucléole et le métabolisme des ARN

Il a été montré qu'un grand nombre d'ARN transitent dans le nucléole avant d'être exportés vers le cytoplasme (Boisvert et al., 2007; Brown and Shaw, 2008; Pederson, 2011; Pederson and Politz, 2000). Parmi ces derniers, des ARN transcrits par l'ARNPOL III, tels que les ARN de transfert (ARNt), ont été identifiés (Bertrand et al., 1998; Pederson and Politz, 2000).

Chez les plantes, il semblerait que le nucléole soit également impliqué dans la synthèse des petits ARN interférents, siRNA (short-interfering RNA) ainsi qu'au sein des processus d'épissage et de contrôle des ARNm, avec notamment l'identification de 6 protéines du complexe EJC, Exon Junction Complex (Li et al., 2006; Pendle et al., 2005; Pontes et al., 2006).

Le nucléole participe aussi à l'assemblage de différents complexes tels que les complexes SRP (Signal Recognition Particle), les spliceosome ou encore TR/TRET ou Telomérase (Boisvert et al., 2007; Brown and Shaw, 2008; Jády et al., 2004; Powell, 2015).

Le nucléole un senseur de stress et remobilisateur des protéines

Chez la levure et les mammifères, le nucléole peut agir comme un senseur de stress. En effet, des facteurs de transcription nécessaires à l'activité de l'ARNPol I, comme Rrn3/TIF-IA (voir section – La transcription des ADNr 45S), sont relocalisés vers le cytoplasme en cas de stress (Lewinska et al., 2010). D'autres protéines sont contenues au sein du nucléole et circulent entre celui-ci et le cytoplasme, par exemple la Nucléoline ou les HSP, Heat Shock Protein (Andersen et al., 2005; Borer et al., 1989; Nigg, 1990).

La régulation du taux de protéine p53 par séquestration nucléolaire est un des exemples les plus connus. Dans des conditions normales, la protéine p53 est constitutivement exprimée mais rapidement dégradée par le protéasome après son ubiquitination par la protéine MDM2/HDM2 (Mouse/Human Double Minute 2), une E3 ubiquitine ligase. En conditions de stress, la protéine ARF (Alternative Reading Frame) est libérée du nucléole et relocalisée vers le nucléoplasme où elle interagit avec la protéine MDM2 et l'emprisonne. En conséquence, la protéine p53 est stabilisée dans le noyau et induit toute une cascade enzymatique permettant l'arrêt du cycle cellulaire (Boulon et al., 2010; Olson and Dundr, 2005).

Chez les plantes, le nucléole peut également agir en cas de stress. En effet, lors d'une infection par l'Alfa Mosaic Virus (AlMV), la protéine virale CP est contenue dans le nucléole pour éviter le développement et la multiplication du virus dans la plante (Kalinina et al., 2018).

De plus, deux homologues de p53 ont été trouvées : ANAC082 et SOG1. ANAC082 pourrait être impliquée dans la réponse aux stress impactant le nucléole et /ou les ribosomes (Ohbayashi and Sugiyama, 2018; Ohbayashi et al., 2017). SOG1 est impliquée dans la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire (Kalinina et al., 2018).

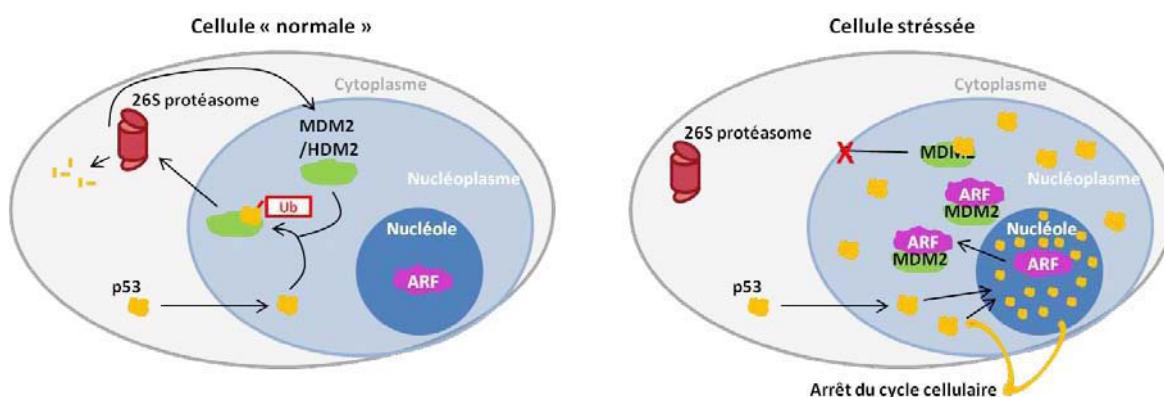


Figure 11 : Régulation nucléolaire de la protéine p53 chez les mammifères (d'après Olson et Dundr, 2005 et Boulon et al., 2010)

La protéine p53, aussi dite « suppresseuse » de tumeur, est régulée via ARF (Alternative Reading Frame), une protéine localisée dans le nucléole des cellules saines ; et MDM2/HDM2 (Mouse/Human Double Minute 2), une E3 ubiquitine ligase. En conditions normales (à gauche), p53 se dirige vers le noyau mais ne s'y accumule pas car prise en charge par MDM2, qui l'ubiquitte et l'adresse au 26S protéasome pour dégradation.

En conditions de stress (à droite), la protéine ARF sort du nucléole pour venir bloquer MDM2, celle-ci est alors incapable de se lier à p53 pour l'ubiquiter et ne peut sortir du noyau. La protéine p53 s'accumule donc dans le noyau et dans le nucléole où elle déclenche toute une cascade d'événements menant à l'arrêt du cycle cellulaire.

Récemment un mécanisme de « rétention » de certaines protéines a été identifié chez les mammifères (Figure 12). Il est orchestré par des longs ARN non codants issus des séquences intergéniques des ADNr en condition de stress. Par exemple, la chaîne induit la synthèse d'un ARN à 16Kb et 22Kb en aval du site d'initiation de la transcription (TIS, Transcription Initiation Site) alors que des variations de pH extracellulaire conduisent à l'accumulation d'ARN localisés 28Kb en aval du TIS. Ces derniers vont cibler des protéines possédant une séquence de détention nucléolaire caractérisée par un motif arginine (R-R-L/I) et deux triplets hydrophobes (L-X-L/V) appelé NoDS pour Nucleolar Detention Signal. Ces transcrits de 400 nucléotides immobilisent et séquestrent les protéines afin de les séparer de leur partenaire en réponse au stress. Parmi ces protéines se trouvent par exemple, les protéines VHL (Von Hippel-Lindau), HSP70 (Heat Shock Protein 70), RNF8 (Ring Finger Protein 8), POLD1 (DNA Polymerase catalytic subunit δ) et DNMT1 (DNA methyltransferase 1).

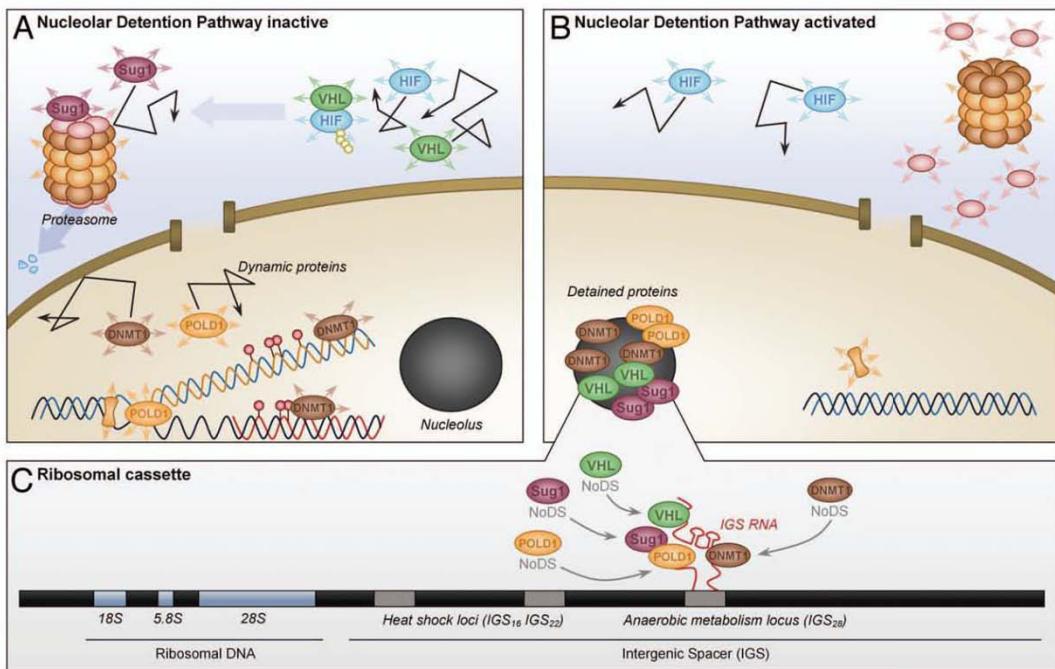


Figure 12 : Régulation moléculaire de la séquestration nucléolaire des protéines chez les mammifères (de Audas et al., 2012)

A : Dans des conditions normales de croissance, les protéines sont très mobiles et actives pour leur rôle dans les différentes fonctions cellulaires, par exemple VHL ubiquitine les protéines cibles pour adressage au protéasome et SUG1/RPT6 participe à la dégradation et fait partie du protéasome, POLD1 se charge de la réplication de l'ADN ou encore DNMT1 qui méthyle l'ADN.

B : Le stress vient activer la voie de détention des protéines au sein du nucléole, elles ne sont donc plus aptes à gérer leur fonction, provoquant l'arrêt de certains processus cellulaires.

C : Capture et immobilisation des protéines grâce à leur motif NoDS (Nucleolar Detention Signal) au sein du nucléole, par interaction avec des longs ARN non-codants issus des séquences IGS (InterGenic Sequence) des ADNr 45S. Ces transcrits IGS sont induits sur des loci spécifiques à chaque stress perçu. Par exemple le stress thermique induit un/des ARN à 16 et 22kb en aval du site d'initiation de la transcription (TIS), alors que ceux induits lors de la modification du pH commencent 28kb en aval du TIS.

Ces protéines sont alors distribuées au sein du centre de détention (Figures 4 et 13), comme le montre la Figure 13C pour la rétention de VHL et HSP70. Ce centre de détention est formé suite à la synthèse de longs ARN non codants et induit une déstructuration du nucléole (Figures 13A et C). Plus précisément, les structures liées à la biogénèse des ribosomes, FC (centres fibrillaires), DFC (composé fibrillaire dense) et GC (composé granulaire), se trouvent relocalisées en périphérie du nucléole en cas de chaleur (Figures 13B et C). (Audas et al., 2012a, 2012b; He et al., 2018; Jacob et al., 2013; Mekhail et al., 2005; Ohbayashi and Sugiyama, 2018).

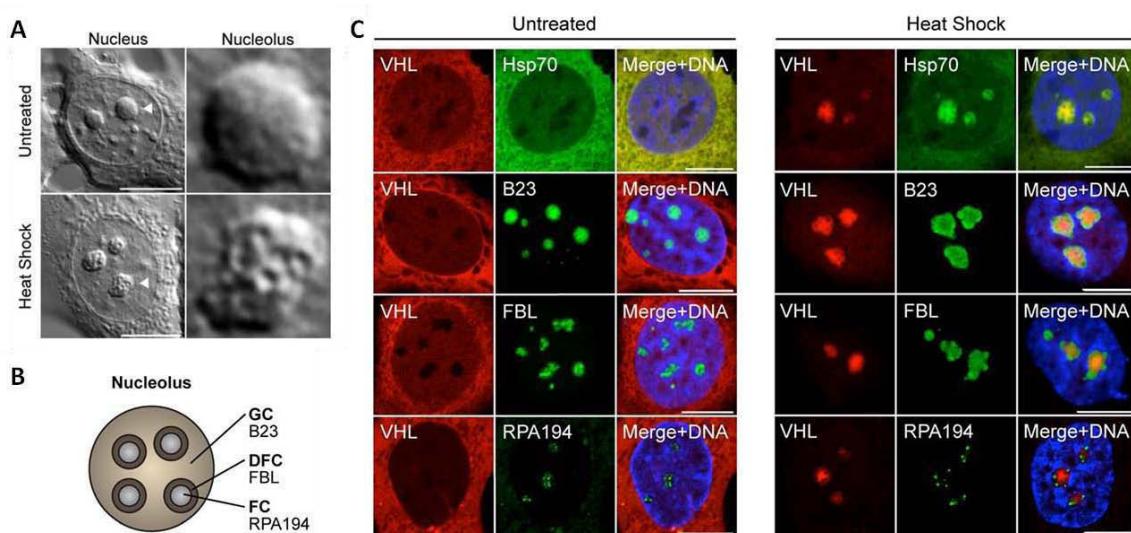


Figure 13 : Impact de la chaleur sur la structure du nucléole (de Jacob et al., 2013)

Untreated signifie les noyaux/nucléoles contrôles, non stressés ; Heat shock correspond aux noyaux/nucléoles soumis à un stress thermique (chaleur).

A : Observation de noyaux (nucleus) et nucléoles (nucleolus) au microscope à contraste d'interférence différentiel (DIC).

B : Schéma explicatif indiquant la localisation « normale » de protéines, marquées en C, représentatives des structures nucléolaires, B23 pour le GC, la Fibrillarine (FBL) pour le DFC et RPA194 pour le FC.

C : Localisation de protéines marquées, schématisées en B, représentatives des structures du nucléole (B23, FBL, RPA194) ou cytoplasmiques (VHL et HSP70), dans des noyaux stressés ou non.

Le Nucléole et les ribosomes

Le ribosome est la machine moléculaire permettant la traduction, c'est-à-dire le passage d'une séquence d'acides nucléotidiques (ARN) à une séquence d'acides aminés (peptides/protéines). Il est lui-même composé de deux sous-unités, la petite 40S et la grande 60S, contenant des protéines ribosomales, et des ARN ribosomiques (ARNr) 18S pour la petite sous-unité ; 5,8S, 25S (28S chez les mammifères) et 5S pour la grande sous-unité (Figure 14).

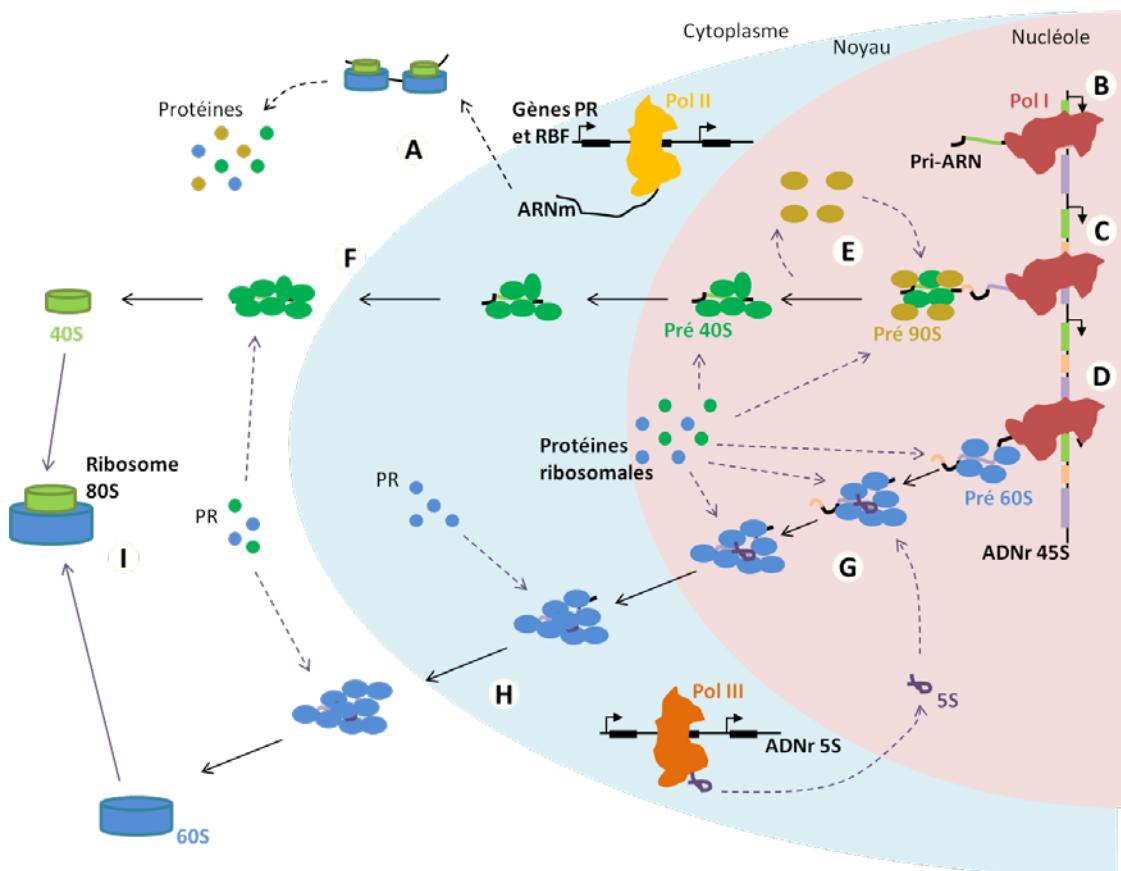


Figure 14 : Biogénèse du ribosome chez les eucaryotes.

Ce processus implique l'activité des ARN Polymérase I, II et III. En effet, l'ARNPol II transcrit en ARN messagers (ARNm) les gènes codants pour les protéines ribosomales et les facteurs de biosynthèse de ribosomes (RBF), qui sont ensuite traduites par les ribosomes en protéines (A). De son côté, l'ARNPol I transcrit les gènes d'ARN ribosomiques 45S, contenant les ARNr 18S, 5,8S et 25S, sous forme d'un pré-ARNr polycistronique (B). L'amorçation de ce ARNr est co-transcriptionnelle puisque des protéines ribosomales et des RBF se lient au pré-ARNr pendant sa transcription (C et D). Ainsi, le pré-complexe 90S se forme en début de transcription (C), puis des RBF, tel que le complexe U3snRNP, se détachent du 90S et de PR s'ajoutent pour donner la pré-sous-unité 40S (E). La pré-40S est ensuite exportée du nucléole vers le cytoplasme pour subir les derniers événements de maturation et former la sous-unité 40S mature (F). Pendant la fin de la transcription, des protéines ribosomales et d'autres RBF se lient au précurseur des ARNr contenant les séquences 5,8S et 25S, formant la pré-sous-unité 60S (D). L'ARNr 5S, transcrit par l'ARNPol III dans le noyau, rejoint ensuite la pré-60S, avec des PR (G). La pré-60S est ensuite maturée tout au long de son trajet vers le cytoplasme pour donner la sous-unité 60S mature (H). Les 40S et 60S matures s'assemblent ensuite pour former le ribosome 80S fonctionnel pour la traduction (I).

Cette figure est générale et les différentes étapes seront présentées dans les paragraphes qui suivent.

Par ailleurs, ces éléments sont susceptibles d'être modifiés, par exemple moins de protéines ribosomales ou de leurs isoformes différentes (voir Les protéines ribosomales) ou encore un changement dans la séquence des ARNr (voir Les ARN ribosomiques 5S et Les gènes d'ARN ribosomiques 45S – Organisation des ADNr 45S), on parle d'hétérogénéité du ribosome. De même il faut noter que les ADNr 45S et 5S sont sur des loci différents et séparés chez les mammifères et plusieurs, tandis qu'ils sont organisés en tandem chez la levure (voir La transcription des ADNr 45S – Promoteur des ADNr).

Les protéines ribosomales

Les ribosomes eucaryotes comptent environ 80 protéines ribosomales (PR) réparties sur les deux sous-unités constituant le ribosome 80S : la petite sous-unité 40S, dénombrant environ 33 protéines appelées RPS (Ribosomal Protein Small subunit), et la grande sous-unité 60S qui contient environ 47 PR, appelées RPL pour Ribosomal Protein Large subunit. Il faut cependant noter que la protéine RPL28e est manquante chez la levure (Kressler et al., 2017).

La structure 3D des PR explique leur liaison aux ARNr ainsi que leur forte cohésion, du fait de leur tendance à l'agrégation. Cependant, de nombreuses chaperonnes, telles que Acl4 chaperonne de RPL4, prennent en charge des PR spécifiques pour les solubiliser, les protéger de la dégradation en rendant les résidus lysine inaccessibles et guider les PR jusqu'aux pré-sous-unités (Huber and Hoelz, 2017; Melnikov et al., 2012; Pillet et al., 2017).

Les protéines ribosomales sont codées par plusieurs d'une centaine de gènes, transcrits par l'ARNPo II dans le noyau (Figure 14A). Chez *Saccharomyces* les 78 PR sont codées par 19 gènes simples copies et 59 paires de gènes paralogues. Les gènes des PR sont très conservés entre les génomes eucaryotes et leurs promoteurs possèdent des motifs communs de liaison pour des facteurs de transcription. Ceci permet une co-régulation des PR (Hu and Li, 2007; Reja et al., 2015).

Chez *A. thaliana* et chez *O. sativa*, mais aussi chez les autres eucaryotes, on peut ainsi retrouver les boîtes : *telo* (taAACCCCTAA), *tef* (ARGGRYANNNNNGT) et les motifs *site II* (TGGGCC et T GGGCT) dans de nombreux promoteurs de gènes codants pour des PR (Gaspin et al., 2010; Regad et al., 1994; Trémousaygue et al., 2003). De plus, l'association *site II* et *telo* est retrouvée dans 153 promoteurs de gènes codant pour des PR sur les 249 répertoriés chez *A. thaliana* (Trémousaygue et al., 2003).

Chez la levure, 127 des 137 gènes sont co-régulés par la voie Rap1/FIS/Hmo1, dans laquelle Rap1 et Fhl1 sont liés aux promoteurs des gènes des PR (Figure 15), et au moment de la transcription ils recrutent Ifh1 et Sfp1, formant le complexe FIS, puis Hmo1 pour décaler le premier nucléosome et permettre l'accès à l'ARNPo II (Hu and Li, 2007; Reja et al., 2015).

Chez les mammifères et la levure, la synthèse des PR est régulée par la protéine cible de la rapamycin (Target Of Rapamycine) TOR (Figure 15). C'est une kinase, sensible au glucose, qui cible la voie FIS/Hmo1 chez la levure. En agissant sur Hmo1, TOR co-régule également l'expression des ADNr chez la levure et chez les mammifères en permettant la

phosphorylation et le positionnement de UBF (l'homologue de Hmo1), un facteur de transcription de la ARNPol I, sur le promoteur des ADNr 45S (Hannan et al., 2003 ; Lempäinen and Shore, 2010; Xiong and Sheen, 2014; Xiong et al., 2013). Chez *A. thaliana*, TOR induit également l'expression des ADNr 45S en se fixant sur leur promoteur et la partie 5'ETS (Ren et al., 2011). De plus, TOR est un régulateur du cycle cellulaire et de la croissance chez la levure, les mammifères et les plantes (Hannan et al., 2003; Lempäinen and Shore, 2010; Xiong and Sheen, 2014).

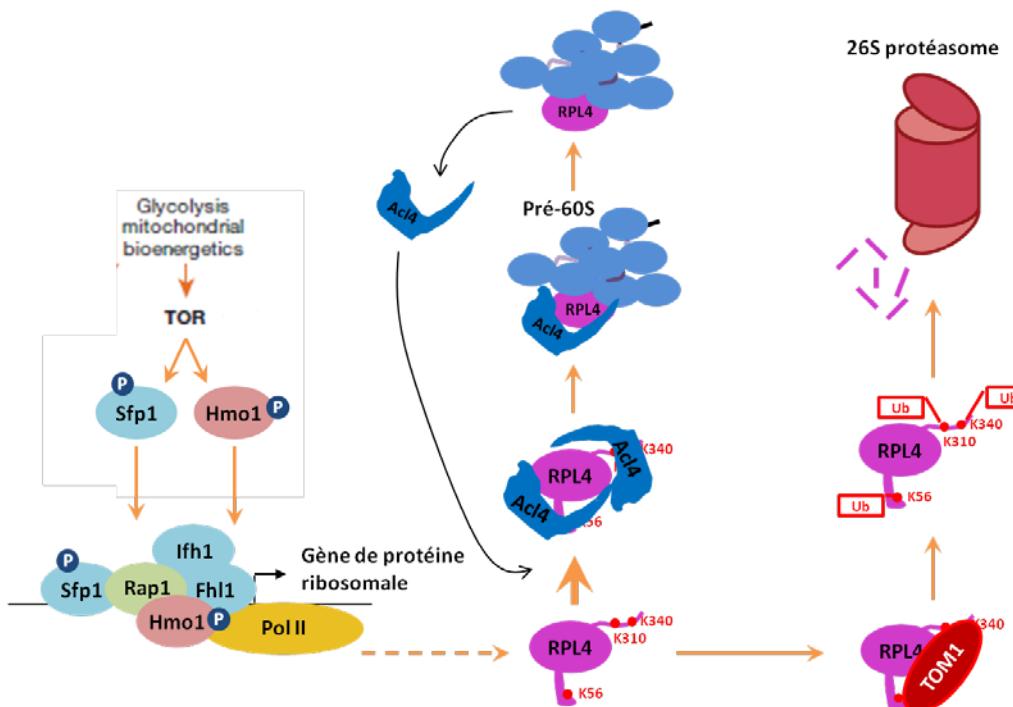


Figure 15 : Schéma simplifié de la régulation et de la « vie » des protéines ribosomales chez la levure (d'après Huber et Hoelz, 2017, Lempäinen et Shore 2009 et Xiong et al 2013)

En présence de glucose, la cellule contient l'énergie nécessaire pour engager la voie de régulation par TOR, montrée très partiellement ici. TOR va phosphoryler des facteurs de transcription pour initier l'expression de gènes de protéines ribosomales (PR). Une fois la PR créée (ici RPL4), elle va être prise en charge par une chaperonne qui lui est spécifique (ici Acl4) pour être amenée à la sous-unité dont elle fait partie. Cette chaperonne a pour but de protéger les résidus lysine sur la boucle et la queue de la PR, qui sinon sont ubiquitinés par TOM1 et la PR est adressée au 26S protéasome pour dégradation.

Chez l'homme les protéines ribosomales peuvent également influencer le cycle cellulaire dans le cas des cancers. En effet, les PR vont activer la protéine suppresseuse de tumeur p53 en se liant à MDM2. Les PR, telles que RPL11, vont alors jouer le même rôle que ARF dans la régulation de p53 en cas de stress (voir paragraphe Nucléole stress). La dégradation de p53 ne se faisant plus, elle s'accumule dans le noyau et le nucléole et induit l'arrêt cellulaire (Zhang and Lu, 2009; Zhou et al., 2015).

Des mutations sur des gènes codant pour des PR, ou pour des facteurs de la biogénèse des ribosomes (RBF, Ribosome Biogenesis Factor), peuvent entraîner des ribosomopathies chez l'homme et les mammifères (Armistead and Triggs-Raine, 2014; Kressler et al., 2017). Chez les plantes, ces mutations apparaissent sous le phénotype nommé « feuilles pointues » ou

« pointed leaves » et sont souvent plus petites, nanisme (Lijsebettens et al., 1994; Pontvianne et al., 2007).

Les protéines ribosomales en excès sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome, dans le noyau ou le nucléole, et non pas par autophagie dans le lysosome (Figure 15). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les PR ne peuvent être produites en excès grâce à un système de régulation nommé ERISQ (pour Excess Ribosomal Protein Quality Control) dans lequel la protéine Tom1 (Huwe1 chez l'homme) ubiquitinise les PR en excès sur un résidu lysine, qui n'est pas accessible lorsque les PR sont assemblées aux pré-sous-unités. Les PR sont ensuite adressées au protéasome pour dégradation (Lam et al., 2007; Sung et al., 2016a, 2016b).

Petite sous-unité
(Ribosomal Protein Small subunit)
d'après O'Donohue et al., 2010

Nucléole (pré-90S)	Précoce		Intermédiaire		Tardive	
	P22	PU3	P22	PU3	P22	PU3
S3a	X	X	S9	X	SA	X
S4	X	X	S3	X	S2	X
S5	X	X	S21		S10	X
S6	X	X			S12	X
S7	X	X			S15	
S8	X	X			S17	X
S11	X				S18	X
S13	X	X			S19	
S14					S20	X
S15a	X				S26	
S16					S27a	X
S23	X	X			S29	
S24	X				S30	
S25	X					
S27						
S27L						
S28						

Grande sous-unité
(Ribosomal Protein Large subunit)
d'après Chen et al., 2017

Nucléole/Noyau	Précoce		Intermédiaires		Tardives		Non classées	P22 PU3	Cytoplasme			
	P22 PU3		P22 PU3		P22 PU3				Accrochage tardif			
	P22	PU3	P22	PU3	P22	PU3			P22	PU3		
L3	X		L9	X	L2	X	L1	X	L10	X		
L4	X		L17	X	X		L14	X	L12			
L6	X		L19		L11	X	L15	x	L24	X		
L7	X		L23	X	L21	X	L22	X	L29	X		
L8			L25		L28		L30	X	L40			
L13	X		L26		L43		L38		L41			
L16	X		L27	X			L39		L42			
L18	X	X	L31				(L28e)	X	P0	X		
L20			L34						P1	X		
L32			L35						P2			
L33			L37									
L36												

Figure 16 : Tableaux référençant les protéines ribosomales

Le tableau du haut correspond aux protéines de la petite sous-unité (les RPS). Elles sont réparties en trois catégories, les précoce, intermédiaires et tardives dans l'assemblage à la sous-unité ribosomale ; et sont aussi réparties en deux classes, celles impliquées dans l'initiation (rouge) de la maturation des ARNr et de la sous-unité, et celles impliquées dans la progression de la maturation (vert).

Dans le tableau du bas sont référencées les protéines de la grande sous-unité (RPL). Elles interviennent soit de manière précoce (rouge), intermédiaire (bleue) ou tardive (vert) dans l'assemblage des sous-unités ribosomales. Certaines sont même très tardives (elles s'assemblent aux sous-unités dans le cytoplasme) et d'autres sont « non classées », c'est-à-dire qu'on ne sait pas quand elles interviennent.

A ces tableaux ont été ajoutées deux colonnes nommées P22 et PU3, correspondant aux protéines retrouvées dans le protéome à 22°C que nous avons publié (Résultats Partie 1-1) ou aux protéines retrouvées lors de la purification de l'U3snRNP (réalisée par Saez et al., 2004) respectivement.

Les protéines ribosomales s'insèrent dans les pré-sous-unités du ribosome au fur et à mesure de la maturation et de l'assemblage des sous-unités. Ainsi les PR ont été définies pour s'assembler au stade précoce, intermédiaire ou tardif de la formation des sous-unités, ou encore dans les stades d'initiation et de progression de la maturation des ARNr (Figure 16). Mais cela reste très subjectif car nous savons maintenant que les PR s'associent également de manière transitoire aux sous-unités en formation, avant de se fixer définitivement. Il est donc possible de retrouver de très nombreuses PR au sein du nucléole, même si elles ne sont pas encore intégrées dans la sous-unité dont elles dépendent (Chen et al., 2017; O'Donohue et al., 2010).

Par ailleurs, il arrive que la composition en protéines ribosomales change d'un ribosome fonctionnel change, créant un ribosome hétérogène. Cela a été observé chez les mammifères et chez les plantes, notamment par manque en protéines ribosomiques (Rodriguez-Celma et al., 2013; Shi et al., 2017; Wang et al., 2013).

Par exemple, chez *Arabidopsis*, la composition des PR intégrées dans le ribosome change en fonction de l'apport en phosphate ou en fer (Figure 17). De plus, dans le cas du fer, il a été démontré que la composition en PR des ribosomes peut changer entre les cellules issues des feuilles et celles venant des racines (Rodriguez-Celma et al., 2013; Wang et al., 2013).

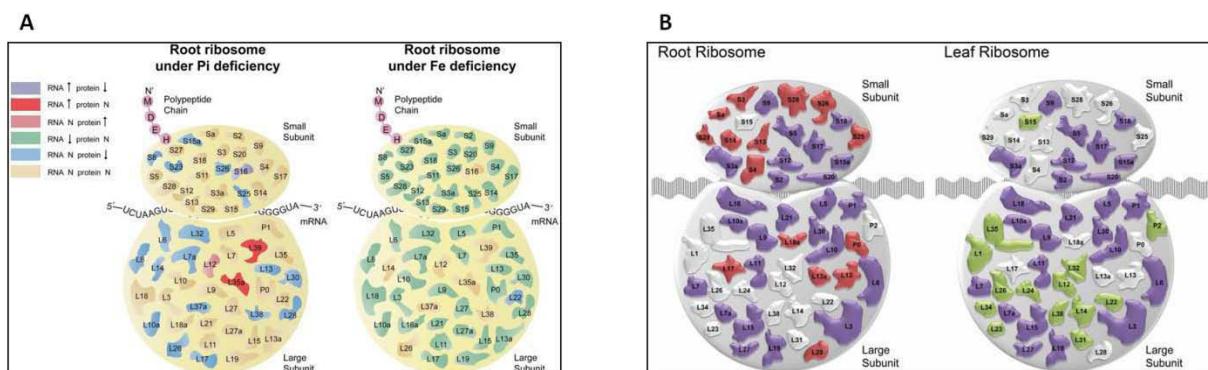


Figure 17 : Hétérogénéité des ribosomes d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de déficience en fer (Fe) ou en phosphate (Pi)

A : Prédiction de ribosomes racinaires en déficience en Pi ou en Fe (de Wang et al., 2013). En violet et en bleu on retrouve les protéines sous exprimées, les surexprimées en bordeaux. Les autres protéines n'ont pas été détectées.

B : Composition des ribosomes de feuilles et de racines en cas de déficience en Fer (de Rodriguez-Celma et al., 2013). Les protéines rouges et vertes, pour les racines et les feuilles respectivement, sont sous exprimées en carence en fer, les violettes sont celles sous exprimées dans les deux parties de la plante. Celles en blanc ne semblent pas être impactées par la carence.

A cela on peut également ajouter le fait que les PR peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation ou l'acétylation. De même, une protéine peut être codée par différents gènes paralogues. Ces changements vont entraîner des modifications au niveau structural des PR et influer sur leur fonction et/ou association aux autres PR et/ou ARNr. Cela va aussi entraîner un changement au niveau de la traduction, certains ARNm sont préférentiellement traduits en fonction de la composition en protéines du ribosome (Genuth and Barna, 2018a, 2018b; Gilbert, 2011; Guo, 2018; Shi et al., 2017).

Les ARN ribosomiques 5S

Les gènes ribosomiques 5S (ADNr 5S) sont des gènes fortement répétés. Leur nombre peut aller de quelques dizaines chez *E. coli* à quelques centaines chez l'homme et plusieurs milliers chez les plantes (Campell et al., 1992; Condon et al., 1995; Schneeberger et al., 1989; Sørensen and Frederiksen, 1991).

Chez la levure, les copies 5S sont localisées en opéron avec les ADNr 45S. Ce n'est pas le cas chez les plantes et chez les animaux (Pikaard, 2002).

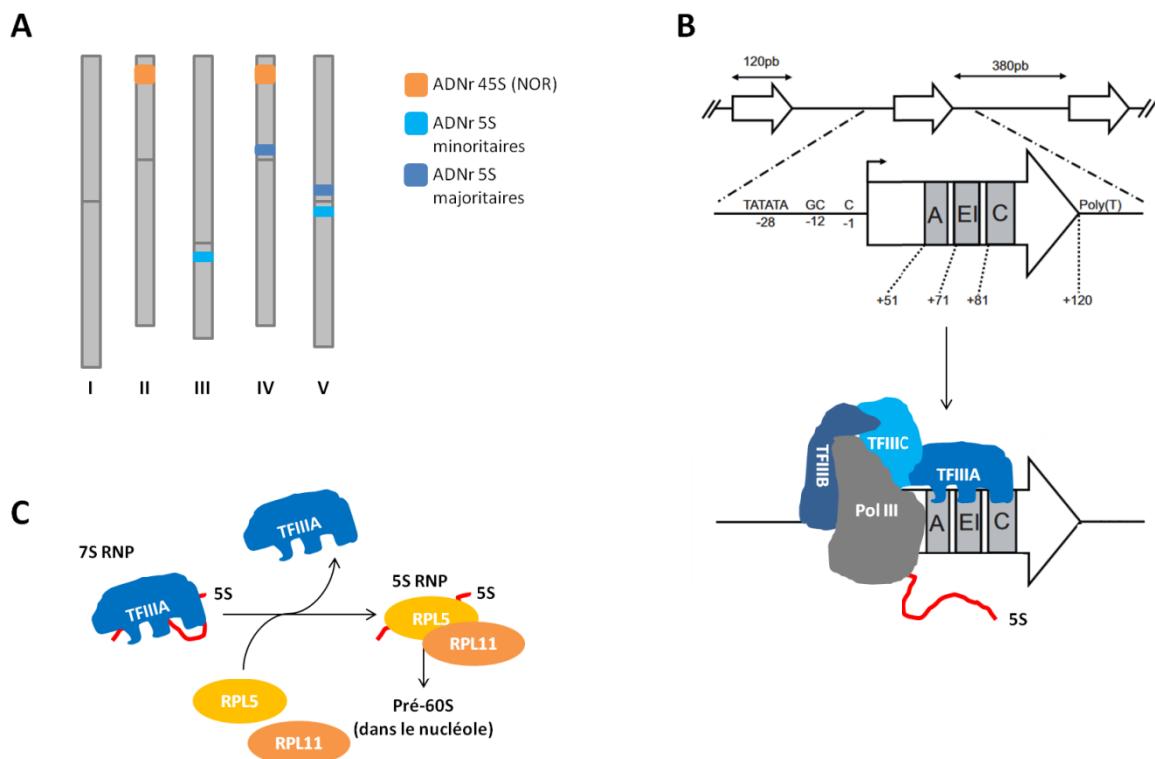


Figure 18 : Organisation, transcription et prise en charge des ADNr 5S chez *A. thaliana* Columbia (d'après Simon, 2016)

A : Localisation de s NOR (orange) et de s loci d'ADNr 5S (bleu), avec les copies majeuritaires en bleu foncé et les minoritaires en bleu clair.

B : Une unité d'ADNr 5S (500pb) est composée d'une séquence transcrive (120pb) et d'une séquence intergénique (380pb). On retrouve des éléments promoteurs aussi bien de la séquence transcrive que dans les boîtes A et C, et un élément intermédiaire (EI). La séquence transcrive est suivie d'une séquence polyT, et précédée d'une boîte de type TATA box, d'un di-nucléotide GC 12 nucléotides avant le site d'initiation de la transcription (TIS) et une cytosine juste en amont du TIS. Lors de la transcription, le facteur TFIIIA se lie aux éléments promoteurs A, C et EI, recrute TFIIIC, qui lui-même recrute TFIIB pour le positionner sur la TATA box. Ensuite arrive l'ARNPol III pour transcrire l'ADNr 5S.

C : Une fois l'ADNr 5S transcrit, il est pris en charge par TFIIIA, formant le complexe 7S RNP, pour être stocké dans le cytoplasme. Pour être amené au nucléole, il se lie à RPL5 et RPL11 pour former le complexe 5S RNP qui s'intègre directement dans la pré-60S.

Chez *A. thaliana*, environ 2000 copies sont dénombrées dans les régions péri-centromériques des chromosomes III, IV et V (Figure 18A) et sont transcrives par l'ARNPol III (Figures 18B et 14G) dans le nucléoplasme (Campell et al., 1992; Simon et al., 2018). Ces copies sont organisées en tandem, les séquences transcrives étant de 120 paires de base (pb), séparées les unes des autres par des séquences intergéniques de 380 pb (Figure 18B, d'après Simon, 2016). En aval des séquences transcrives se trouve une extension polyT, en amont une boîte de type TATA box et des nucléotides positionnés spécifiquement, tels que G et C en -12 et C en -1.

A l'intérieur de la séquence transcrise se trouvent des séquences promotrices, appelées ICR pour Internal Control Region, contenant les boîtes A et C, ainsi que l'élément intermédiaire EI (Cloix et al., 2002, 2003; Paule and White, 2000; Simon, 2016).

Toujours chez *A. thaliana*, les ARNr 5S présentent des variabilités de séquences, dans la longueur et les motifs, au niveau des polyT qui sont spécifiques à chaque locus. De plus, seules les copies dites « majoritaires » présentes sur le chromosome IV (Figure 18A) et sur le « master locus » du chromosome 5 (sur le bras court) sont transcrrites. Les autres, « minoritaires », peuvent être transcrrites mais les ARNr seront rapidement dégradés, ou seront accumulés à des stades jeunes (à deux jours après germination) ou dans certains mutants affectés sur la régulation épigénétique ou dans l'organisation de la chromatine.

Cependant, les séquences hétérogènes (41 allèles différents chez les mammifères) sont transcrrites de manière tissus spécifiques et sont incorporées au sein de ribosomes fonctionnels (Cloix et al., 2002; Mathieu et al., 2003; Parks et al., 2018; Simon, 2016; Vaillant et al., 2008).

La transcription des ARN 5S (Figure 18B) nécessite les facteurs de transcription TFIIIA, B et C. TFIIIA se fixe sur l'ICR et permet le recrutement de TFIIIC, qui à son tour recrute TFIIIB et ce dernier se positionne sur la TATA box avant de recruter l'ARNPol III (Bieker et al., 1985; Kassavetis et al., 1991; Stutzer and Brown, 1985). L'ARNPol III reconnaît ensuite l'enchaînement polyT qui est le signal d'arrêt de la transcription (Bogenhagen and Brown, 1981; Cloix et al., 2003).

Après sa transcription, l'ARNr 5S est mûri en son extrémité 3' et pris en charge par TFIIIA, formant le complexe 7S RNP (Figures 18C et 14G), pour être stocké dans le cytoplasme ou bien par RPL5 et RPL11, sous la forme 5S RNP, pour être adressé au nucléole et s'incorporer dans la pré-60S (Allison et al., 1991; Calviño et al., 2015; Guddat et al., 1990; Layat et al., 2012; Madru et al., 2015).

De manière générale, l'ADNr 5S des copies majoritaires est hypométhylé et les histones des nucléosomes présentent de marques positives à la transcription, comme l'acétylation de l'histone H3 ou la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). À l'inverse, les copies minoritaires sont enrichies en marques répressives de transcription comme l'hyperméthylation de l'ADN ou encore la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, H3K9 (Mathieu et al., 2003; Simon et al., 2018; Vaillant et al., 2008).

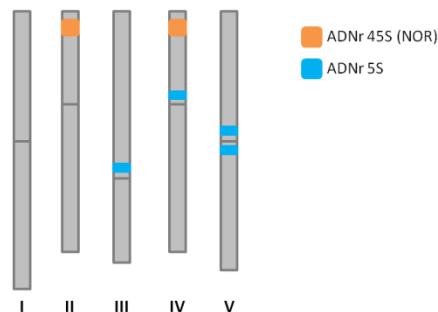
Les gènes d'ARN ribosomiques 45S

Organisation des ADNr 45S

Les gènes d'ADNr 45S sont localisés au niveau des régions organisatrices du nucléole (NOR). Ils sont présents en de très nombreuses copies ; entre 150 et 200 chez la levure, environ 400 chez l'homme, près de 14000 chez *Allium cepa* (oignon) ; et sont organisés en tandem (Raška et al., 2004; Stępiński, 2014).

Chez *A. thaliana* (Figure 18A et 19A), près de 1400 copies ont été identifiées et sont réparties dans deux NOR, situés sur les bras courts des chromosomes II et IV (Pikaard, 2002). Cependant, de récents travaux ont démontré l'instabilité du nombre de copies via des croisements interspécifiques d'*Arabidopsis thaliana* (Rabanal et al., 2017a, 2017b).

A



B

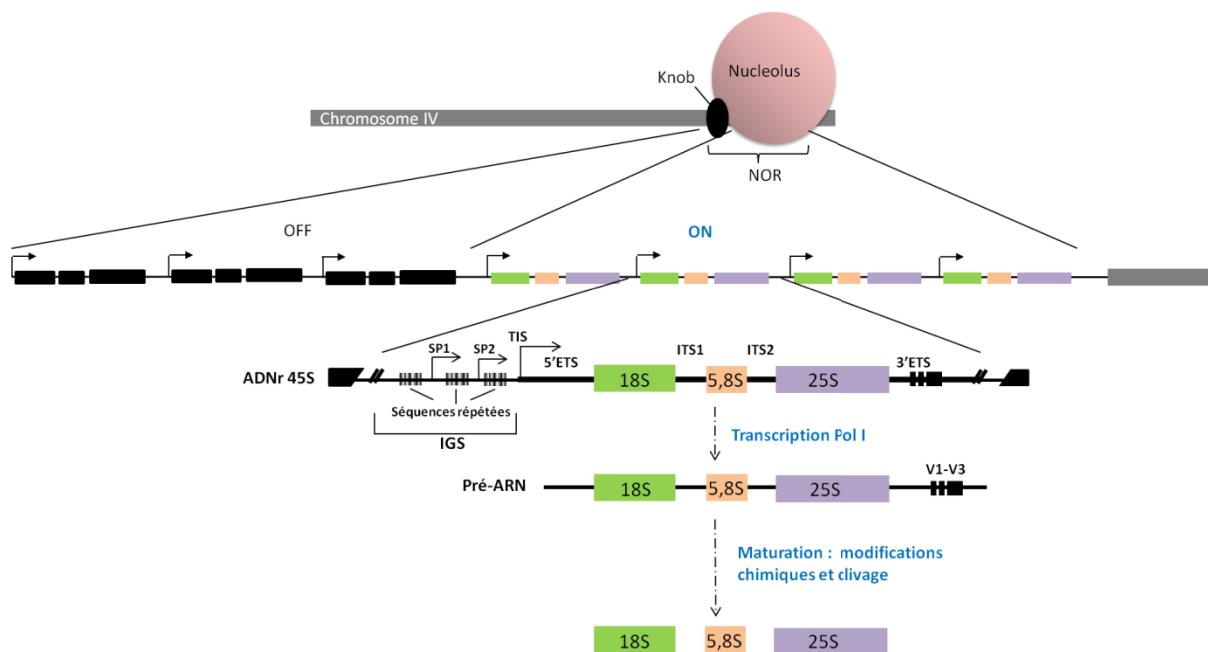


Figure 19 : Représentation schématique de l'organisation des gènes d'ARN ribosomiques 45S chez *A. thaliana* Col-0
A : Localisation des gènes d'ARN ribosomiques 45S et 5S. Les ADNr 45S, NOR (orange), sont situés aux extrémités des bras courts des chromosomes II et IV. Tandis que les gènes 5S (bleu) sont situés dans les régions péri-centromériques des chromosomes III, IV et V.

B : Schéma d'une région nucléolaire (NOR) active et d'une unité d'ADNr 45S transcrète. Au sein d'un NOR, les copies sont organisées en tandem, les copies non-transcrites inactives, dites OFF, sont condensées sous la forme de knob, tandis que le nucléole se forme autour des copies transcrètes, ON. Une unité d'ADNr 45S contient la séquence transcrète du pré-ARN polycistronique à partir du site d'initiation de la transcription (TIS), contenant les ARNr 18S, 5,8S et 25S, séparés par des espaces internes (ITS1 et ITS2) et encadrés aux extrémités par des espaces externes (5'ETS et 3'ETS). Chaque unité est séparée de ses voisines par des séquences intergéniques contenant des séquences répétées, des promoteurs externes (SP1 et 2) et le promoteur des ADNr. Dans la région 3'ETS, on distingue trois types majeurs de variants V1, V2 et V3.

Chaque unité d'ADNr 45S (Figure 19B) est composée des séquences des ARN ribosomiques 18S, 25S et 5,8S, séparées par des espaces internes (ITS1 et ITS2) et encadrées par des espaces externes (5'ETS et 3'ETS), le tout transcrit en un seul précurseur polycistronique par l'ARNPol I dans le nucléole (Grummt, 2003; Pikaard, 2002). Chaque unité est séparée des autres par une séquence intergénique (IGS) contenant le promoteur, des promoteurs espaces (SP1 et SP2), des séquences répétées, et des séquences de liaison aux facteurs de transcription de la ARNPol I (McStay and Grummt, 2008).

Généralement, les séquences codant les ARNr sont hautement conservées entre les différentes espèces, même les plus éloignées. Cependant récemment, il a été démontré que chez les mammifères que les ARNr peuvent présenter des variabilités de séquences (plus de 1000 allèles pour le 28S, 630 pour le 18S et 50 pour le 5,8S), s'exprimant en fonction du tissu où ils sont transcrits, et sont insérés dans les ribosomes pour participer à la traduction (Parks et al., 2018).

En revanche, une variabilité considérable est observée dans les régions intergéniques (Raška et al., 2004; Stępiński, 2014). Chez les animaux, les IGS sont plus bien grandes que chez les plantes. Par exemple, chez l'homme, une IGS fait entre 10 et 30 Kb contre 2 à 5Kb chez *A. thaliana* (Stępiński, 2014; Sylvester et al., 2004). De fortes divergences de séquence sont également observées entre différentes espèces de plantes telles que le radis *Raphanus sativus* (Delcasso-Tremousaygue et al., 1988; Delseny et al., 1979), *Arabidopsis thaliana* (Gruendler et al., 1991; Havlová et al., 2016), le riz *Oryza sativa* (Cordesse et al., 1993) ou encore les genres *Brassica* (Tremousaygue et al., 1992) et *Nicotiana* (Borisjuk et al., 1997).

Cette hétérogénéité est aussi retrouvée au sein d'une même espèce, avec par exemple, près de 60% de différence en séquence nucléotidique entre différentes espèces de fèves : *Vicia faba*, *V. angustifolia* et *V. hirsuta* (Kato et al., 1990; Ueki et al., 1992; Yakuwa and Nishikawa, 1992)

De façon très intéressante, chez *A. thaliana Columbia* (Col-0), d'importantes variations de séquences ont été identifiées dans la région 3'ETS (Figure 19B). Ces dernières permettent de distinguer trois formes majeures de gènes d'ADNr 45S appelées variants 1, 2 et 3 (Abou-Ellail et al., 2011; Chandrasekhara et al., 2016; Pontvianne et al., 2010). Ces différentes formes se distinguent les unes des autres par un motif de 47pb dont la répétition varie en fonction de plusieurs variants (Abou-Ellail et al., 2011). De manière intéressante, la représentation de chacun de ces variants au sein du génome est assez hétérogène. Le variant 1 (Var1 ou V1), le plus polymorphe, représente à lui seul près de la moitié de l'ensemble des copies (50%) alors que les variants 2 et 3 représentent 30% et 20% des copies (Chandrasekhara et al., 2016; Pontvianne et al., 2010). Curieusement, le Var1, fortement représenté, n'est naturellement pas exprimé dans les différents tissus de la plante, excepté dans les graines et embryons en cours de germination, alors que les autres variants sont transcriptionnellement actifs (Chandrasekhara et al., 2016; Mohannath et al., 2016; Pontvianne et al., 2010).

Gènes actifs et inactifs

Les premiers gènes d'ARNr actifs ont été visualisés par microscopie électronique (Figure 20) sur des oocytes de la salamandre *Triturus viridescens*. Les gènes ribosomiques en cours de transcription forment des structures en arbre de Noël appelées « Christmas trees » (Miller and Beatty, 1969). Dans cette structure, le tronc de chaque arbre représente l'ADNr, les branches désignent les pré-ARNr en cours de transcription (environ une centaine par branche) et les petites bulles localisées à l'extrémité de chaque branche correspondent aux complexes de maturation et d'assemblage. Ces structures typiques de la transcription par l'ARNPol I (les SSU/90S processome – voir section Biogenèse et Assemblage) ont été observées plus tard chez la levure (Raška et al., 2004; Rattner et al., 1982), les mammifères (Harper and Puvion-Dutilleul, 1979; Puvion-Dutilleul et al., 1977) et sembleraient être présentes chez les plantes également (González-Melendi et al., 2001; Shaw et al., 2002). D'ailleurs, il apparaît que chez le pois (Figure 20) cette structure est plus compacte que chez la salamandre, le rat et la levure (Figure 20).

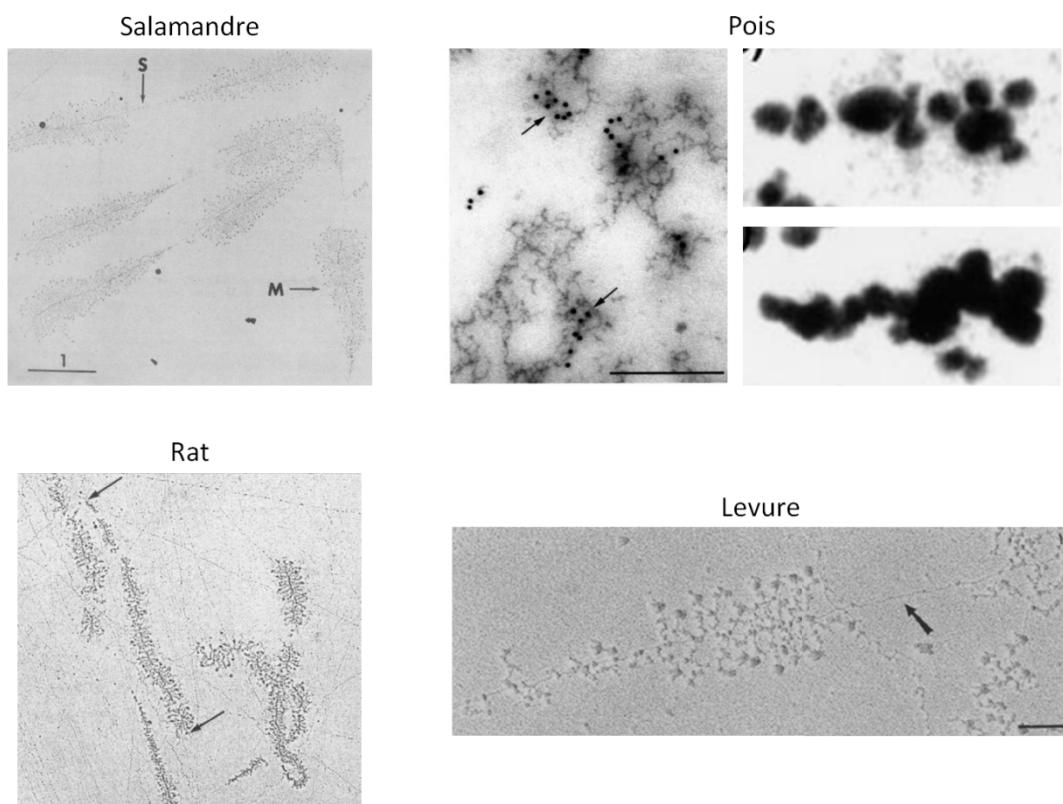


Figure 20 : Observation des « Christmas tree » en microscopie électronique chez différents eucaryotes

Chez la **salamandre** (Miller et Beatty, 1969, échelle 1μm), les auteurs ont dénommé M une « unité matrice » et S les « segments sans matrice ». En réalité, M correspond à une unité d'ADNr 45S transcrise par l'ARNPol I. La partie S peut soit correspondre aux séquences intergéniques (IGS) des ADNr 45S, soit aux copies inactives, OFF.

Chez le **pois** (González-Melendi et al., 2011, échelle 200nm) a droite deux unités sont entrées individuellement et à gauche plusieurs unités en cours de transcription (notamment deux pointées par des flèches).

Chez le **rat** (Puvillon-Dutilleul et al., 1977). Une unité est délimitée par les deux flèches.

Chez la **levure** (Rattner et al., 1982). Dans l'article les auteurs définissent la partie pointée par la flèche comme « un prolongement de la région en cours de transcription ». Il s'agit en fait des séquences intergéniques.

On peut ainsi distinguer deux catégories de gènes d'ADNr : des gènes transcrits, actifs, formant les « arbres de Noël » et des gènes non transcrits, inactifs (Grummt, 2003 ; Reeder, 1998).

Au sein de la cellule, seule une petite fraction des ADNr est exprimée : les gènes actifs, dits « ON », sont pourvus ou contenant peu de nucléosomes et associés aux transcrits naissants (Grummt, 2010). Les autres gènes, inactifs dits « OFF », sont caractérisés par la présence de nucléosomes disposés de façon régulière le long des unités géniques (Sogo and Thoma, 2004). Chez les mammifères, il a été déterminé qu'approximativement 50% des ADNr étaient actifs (Conconi et al., 1989). En comparaison, chez le petit poisson, seulement 5% des gènes d'ARNr sont transcrits (Shaw et al., 2002). En conséquence, les ADNr existent donc sous deux formes chromatiniennes : l'hétérochromatine, riche en nucléosomes, pour les gènes inactifs et l'euchromatine, contenant peu ou pas de nucléosomes ou bien des nucléosomes non canoniques, pour les gènes potentiellement actifs (Grummt and Pikaard, 2003; McStay and Grummt, 2008).

Le passage d'un état ON à l'état OFF, ou inversement, est contrôlé par des modifications biochimiques de la chromatine, qualifiées d'épigénétiques (Grummt and Pikaard, 2003; McStay and Grummt, 2008; Preuss et al., 2008). Les gènes transcriptionnellement actifs sont caractérisés par une hyperacétylation de l'ADN, une hyperacétylation des histones H4 (et H3 chez les plantes), la di-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me2) et la méthylation de la glutamine sur l'histone H2A. Au contraire, les gènes inactifs sont marqués par une hyperméthylation de l'ADN et la di et tri-méthylation des histones H3 sur les lysines K9 et K20 (Grummt, 2007; Lawrence et al., 2004; Tessarz et al., 2014).

Les gènes d'ARNr exprimés sont contenus dans des structures décrites précédemment, surplombant le nucléole, appelées NAC (Raška et al., 2006b; Stępiński, 2014).

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

La transcription des ADNr 45S

Promoteur des ADNr

Les promoteurs des ADNr 45S des mammifères et de la levure, contenus dans les IGS (Figure 21), sont composés de deux boîtes : le domaine CPE (Core Promoter Element), contenant le TIS, et le domaine UCE (Upstream Control Element), localisé à environ -150pb du TIS, UPE (Upstream Promoter Element) chez la levure (Paule and White, 2000; Raška et al., 2004). Les éléments CPE sont suffisants pour initier la transcription des ADNr 45S par la ARNPol I, et les éléments UPE et UCE stimulent la transcription en permettant l'accrochage de facteurs de transcription (Paule and White, 2000; Raška et al., 2004).

Beaucoup de similitudes sont retrouvées entre les éléments régulateurs des mammifères et de la levure : l'espacement entre le CPE et le domaine UCE/UPE et leur orientation. Cependant, les séquences de ces éléments varient entre levure et mammifères, ce qui peut être expliqué par le fait que la transcription par l'ARNPol I est spécifique à chaque espèce (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt, 2003).

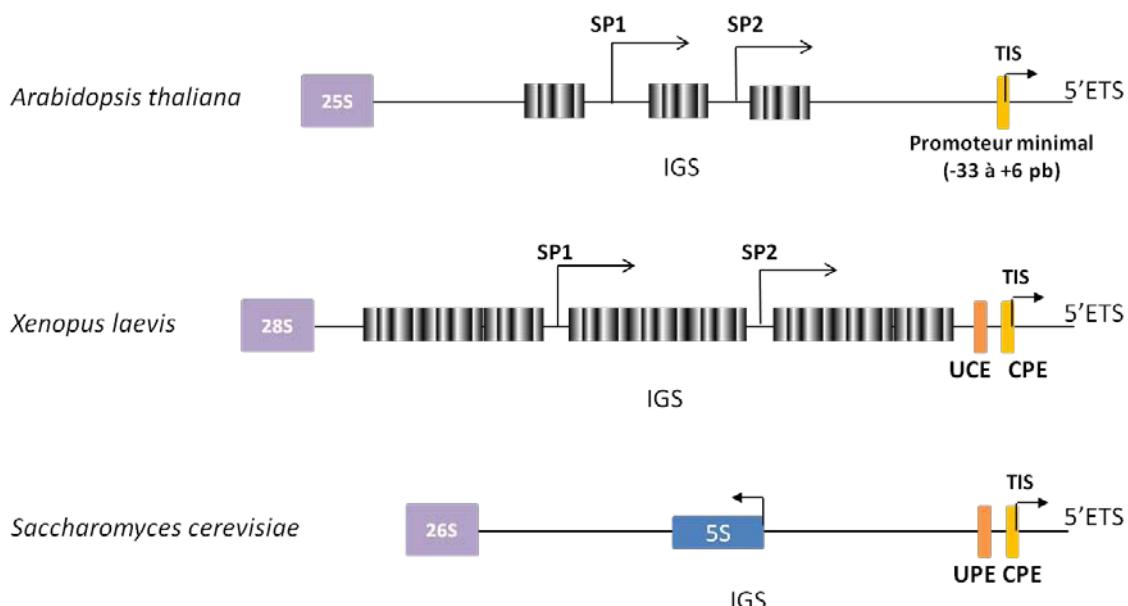


Figure 21 : Schéma des séquences intergéniques de plantes, mammifères et levures (d'après Pikaard 2002 et Goodfellow et Zomerdijk, 2013)

Les séquences intergéniques (IGS) de eucaryotes contiennent le promoteur des ADNr 45S nommés Core Promoter Element (CPE) chez les levures et mammifères. Les CPE sont précédés de séquences activatrices nommées Upstream Control/Promoter Element (UCE chez les mammifères et UPE chez la levure). Par ailleurs, deux promoteurs espaces (SP1 et 2) sont retrouvés dans les IGS des plantes et des mammifères. Les SP sont « encadrés » par des séquences fortement répétées. Chez la levure, les gènes des ARNr 5S sont localisés dans les IGS des ADNr 45S.

Des promoteurs espaces (SP) sont également présents dans les IGS des métazoaires et de nombreux mammifères. Les ARN issus de ces éléments seraient impliqués dans l'autorégulation, par répression, des ARNr (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Paule and White, 2000).

Chez *A. thaliana*, le promoteur proximal se situe entre -55 et +6pb du TIS, mais il suffit de la séquence allant de -33 à +6, le promoteur minimal (Figure 21), pour initier la transcription des ADNr 45S par l'ARNPol I (Doelling and Pikaard, 1995; Doelling et al., 1993; Saez-Vasquez and Pikaard, 1997).

Par ailleurs, deux SP sont également présents dans les IGS d'*A. thaliana*. Ils sont entourés de séquences répétées (Figure 21) qui contiennent un grand nombre de sites de restriction pour l'enzyme Sall. Ces séquences répétées présentent de nombreuses répétitions, de même les promoteurs espaces (SP) peuvent être présents en une ou deux copies et à différentes distances des séquences répétées. Les transcrits issus de ces IGS seraient des précurseurs pour l'enzyme RDR2 (RNA-dependent RNA Polymérase 2), agissant avec les enzymes spécifiques des plantes ARNPol IV et ARNPol V dans la voie RdDM (RNA-directed DNA methylation), voie de méthylation *de novo* de l'ADN (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Havlová et al., 2016; Lawrence et al., 2004; Preuss et al., 2008).

L'ARN Polymérase ADN dépendante I (ARNPol I) et ses facteurs de transcription

L'ARNPol I est une enzyme d'environ 2M Da, contenant environ 30 polypeptides (Saez-Vasquez and Pikaard, 1997). L'ARNPol I permet la transcription des ADNr 45S. Il a été démontré, chez les plantes et les mammifères, que, comme pour l'ARNPol II, l'ARNPol I se retrouve sous forme d'holoenzyme libre, c'est-à-dire qu'une majorité de ses facteurs de transcription sont liés à l'ARNPol I pour former un plus gros complexe protéique hétéromérique apte à initier la transcription (Albert et al., 1999; Grummt, 2003; Hannan et al., 1999; Saez-Vasquez and Pikaard, 1997, 2000). Environ 30 peptides sont présents dans cette holoenzyme chez le brocoli (*Brassica oleracea*) et 55 protéines chez *Xenopus laevis* (Albert et al., 1999; Saez-Vasquez and Pikaard, 1997).

Cependant, il y a des évidences de la formation d'un pré-complexe d'initiation (PIC : Pre-Initiation Complex) autour de ses promoteurs d'ADNr 45S (Figure 22). Le complexe SL1 (promoter Selectivity Factor) chez l'homme, et TIF-IB chez la souris, contient une protéine de liaison à la TATA box (TBP, TATA Binding Protein), au niveau du promoteur (CPE) des ADNr 45S. La TBP est associée à des facteurs TAF (TBP-associated factors) pour former SL1. SL1 se lie à TIF-IA, l'homologue de Rrn3p de la levure chez les mammifères (Bodem et al., 2000). TIF-IA interagit avec les protéines TAF de SL1, faisant le lien entre les ADNr et la machinerie de transcription ARNPol I. Le facteur de transcription UBF (Upstream Binding Factor) améliore la transcription des ADNr en se positionnant sur l'UCE via des boîtes HMG (High-Mobility Group), pour s'approcher physiquement les éléments CPE et UCE. UBF permet ainsi la formation d'une « plateforme » pour accueillir le PIC, mais n'est pas nécessaire à son activité (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt, 2003). Chez les mammifères, la transcription des ADNr 45S nécessite également le facteur de terminaison de la transcription TTF-I (Transcription Termination Factor), qui se lie à l'élément terminateur,

en amont des UCE et CPE, et permet le remodelage de la chromatine en état permissif à la transcription (Langst et al., 1997).

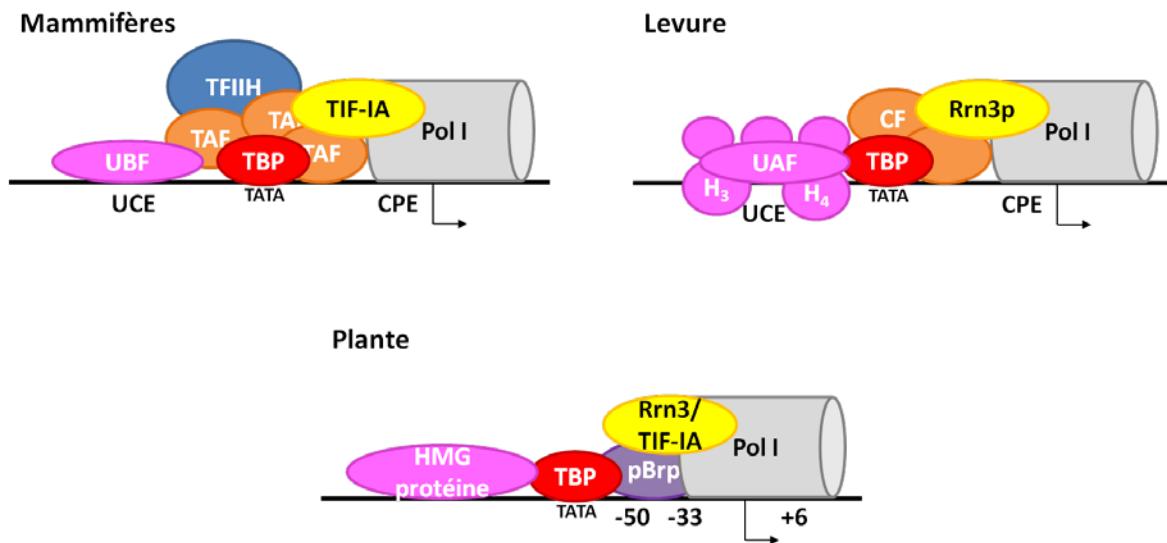


Figure 22 : Schéma des complexes de transcription ARNPol I chez les mammifères et levures (d'après Grummt, 2003) et schéma putatif chez les plantes

La flèche indique le site d'initiation de la transcription (TIS). Le complexe TIF-IB (SL1 chez l'homme, protéines oranges et rouges) se lie aux ADNr au niveau de la TATA box par la protéine TBP et au CPE avec des protéines TAF. TIF-IA (Rrn3p chez la levure), fait le lien entre la ARNPol I est le facteur de transcription TIF-IA. Pour faciliter la transcription, le facteur UBF (UAF chez la levure) se lie au domaine UCE/UPE. Chez les mammifères, la transcription des ADNr est également facilitée par le facteur de transcription général TFIIBH. Chez les plantes, la séquence allant de -33 à +6 est nécessaire pour initier la transcription. Une protéine contenant des domaines HMG a été trouvée ainsi qu'une homologue de Rrn3p/TIF-IA, mais elles n'ont pas été étudiées. De plus, pBrp a été récemment démontré pour être un facteur de transcription de l'ARNPol I chez les plantes.

Chez la levure, c'est le complexe UAF (Upstream Activating Factor) qui se lie à une protéine se fixant à la TATA-box (TBP), qui elle-même interagit avec le complexe CF (Core Factor) étant fixé sur le CPE. CF interagit avec Rrn3p qui fait le lien avec l'ARNPol I (Grummt, 2003).

Chez *A. thaliana*, des protéines TAF et TBP ont été identifiées, ainsi qu'une protéine spécifique aux plantes : pBrp, un facteur de transcription de l'ARNPol I (Imamura et al., 2008; Knutson, 2013; Waterworth et al., 2015). En faisant des recherches par Blastp, des séquences homologues à TIF-IA/Rrn3p, TTF-I et une protéine contenant de multiples boîtes HMG ont été observées mais ne sont pas encore caractérisées.

Mécanismes de régulation de la transcription

Il existe deux grands mécanismes de régulation de la transcription : la régulation du nombre de copies actives et la régulation du taux de transcription des copies actives (Grummt, 2010). Ces mécanismes sont bien décrits chez la levure et les animaux, mais peu sont connus à ce jour chez les plantes.

En plus d'avoir un rôle dans l'accrochage et l'activité de transcription, certains facteurs sont également impliqués dans l'organisation, le modelage de la chromatine au niveau des ADNr 45S. Par exemple, UBF induit le déplacement de l'histone H1 et permet ainsi le maintien de la chromatine en structure permissive à la transcription. De même, SL1 et TTF-I participent au maintien de l'euchromatine, par conservation de l'hypométhylation des promoteurs des ADNr 45S pour le premier, et par remodelage de la chromatine pour le second (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt, 2003; Grummt and Pikaard, 2003).

Les modifications de la chromatine, donc épigénétique, au niveau des ADNr est très importante puisqu'elle permet de définir l'état ON ou OFF de s ADNr 45S. Parmi ces régulateurs, cinq grands complexes ont été analysés chez les mammifères (Figure 23).

De manière générale, le complexe CSB-CSA (Cockaine Syndrom group B & A), localisé dans le nucléole, est considéré comme un activateur de la transcription. CSA se lie aux copies actives de s ADNr 45S , recrute CSB, conjointement avec TTF-I, et le facteur TFIIF ; et interagit avec l'ARNPol I pour stimuler l'initiation de la transcription. Plus précisément, CSB interagit avec G9a, une méthyltransférase de l'histone H3, en méthylant le résidu K9 sur la partie codante des ARNr (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Koch et al., 2014; McStay and Grummt, 2008; Yuan et al., 2007).

Les quatre autres complexes sont plutôt reliés aux copies OFF des ADNr 45S, avec des degrés de répression différents (Figure 23) :

-Le complexe NoRC (Nucleolar Remodeling Complex) est lié à une répression totale des ADNr 45S. Pour être activé, NoRC nécessite la présence du pRNA (promoter-associated RNA), un ARN non codant (150 à 300pb) issu des séquences intergéniques des ADNr. Le facteur de transcription TTF-I se lie au complexe NoRC, composé de protéines TIP5 et SNF2, qui recrute l'histone déacétylase HDAC1, provoquant la déacétylation des histones. Intervient ensuite la déméthylation de l'ADN, par l'action de DNMT, et le remodelage des nucléosomes par NoRC, ce qui induit la répression des ADNr (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt and Pikaard, 2003; McStay and Grummt, 2008; Srivastava et al., 2016).

-Le eNoSC (energy-dependent Nucleolar Silencing Complex) est associé aux copies OFF qui peuvent redevenir ON. Il intervient en fonction de la disponibilité en glucose, en énergie, de la cellule. Si l'apport est suffisant, il y a une forte transcription des ADNr via la voie de régulation TTF-I et le complexe n'est pas assemblé, seules les protéines Nucléométhyline (NML) et l'histone méthyltransférase SUV39H1 restent associées, « inhibées » par la présence d'un ARNr. Mais quand il y a un manque d'énergie, la transcription des ARNr est ralentie, permettant à SIRT1 de se lier à NML et SUV39H1 pour

former le eNoSC. Le eNoSC va alors induire la déacétylation des histones et la méthylation de H3K9, et ainsi réprimer l'expression de sADNr 45S en formant de l'hétérochromatine (Murayama et al., 2008; Srivastava et al., 2016; Yang et al., 2013).

-Le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation complex) intervient lors de la différenciation cellulaire. Il maintient un état « bivalent » de la chromatine qui est transcriptionnellement inactive mais en état permissif à la transcription. NuRD est composé des HDAC1/2 et CHD3/4 (Chromodomain, helicase and DNA-binding 3 and 4) et est recruté, sur les promoteurs des ADNr 45S non-méthylés et contenant des éléments du PIC, par CSB et TTF-I. Les histones possèdent à la fois des marques répressives (H3K27me3) et permisives (H3K4me2) et les nucléosomes sont fermés à la transcription (Srivastava et al., 2016; Xie et al., 2012).

-Le complexe PAPA/SUV4-20h2 intervient majoritairement dans les cellules différencierées. Un long ARN non-codant, PAPA (Promoter and pre-RNA anti-sense), est transcrit par la ARNPol II à partir de séquences d'ADNr, mais en sens inverse de la transcription de ces derniers. Il s'associe avec l'histone méthyltransférase Suv4-20h2 qui va déposer la marque H4K20me3 sur les régions promotrices et des pré-ARNr, empêchant ainsi leur transcription par compaction en hétérochromatine (Parlato et al., 2015; Srivastava et al., 2016).

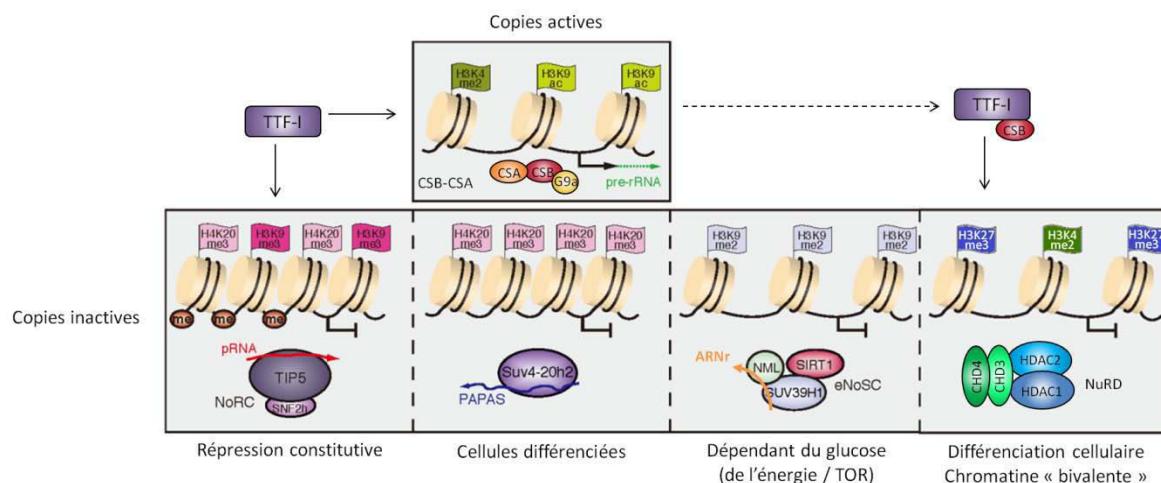


Figure 23 : Complexes de modification de la chromatine des ADNr chez les mammifères (d'après Srivastava et al., 2016 et Parlato et al., 2015)

Le complexe CSA-CSB est associé aux copies actives des ADNr. Tandis que les autres complexes sont associés aux copies inactives. Le complexe NoRC (TIP50 et SNF2B) est activé par un pRNA, issu des îlots d'ADNr, et va remodeler les nucléosomes des ADNr pour former de l'hétérochromatine. Le long ARN non-codant PAPA, issu de la transcription des ADNr en sens inverse par la ARNPol II, s'associe avec Suv4-20h2 dans le même but. Les complexes eNoSC et NuRD permettent une reprise de la transcription plus rapide en ayant une chromatine pas trop compactée, ou parle d'un e chromatine bivalente (marques positives et répressives à la fois) dans le cas de NuRD. Le eNoSC est inactif tant que la cellule a suffisamment d'énergie, une ARNr inhibe l'association de NML et SUVH31 avec SIRT1.

Le facteur TTF-I de la ARNPol I, régule partiellement ces voies, en choisissant d'interagir avec NoRC ou CSB pour induire respectivement une répression ou une activation. TTF-I interagit avec CSB dans le cadre d'une expression également pour venir recruter le complexe NuRD.

Aucun de ces complexes n'a été identifié chez les plantes. Cependant, des orthologues de CSA : AtCSA1a et AtCSA1b ont été trouvés chez *A. thaliana* (Zhang et al., 2010). De même, la nucréométhyline/Rrp8 (Peifer et al., 2013) et CSB/CHR8 (Peng et al., 2008) ont été identifiées chez *A. thaliana*. Mais nous ne savons pas si elles sont impliquées dans l'expression des ADNr, ou si ces mécanismes font intervenir des acteurs encore non identifiés.

La régulation de la transcription peut également se faire au niveau des facteurs de transcription de l'ARNPol I.

De ce fait, la phosphorylation de UBF par la caséine kinase 2 (CK2), la voie TOR ou par ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) améliore son interaction avec SL1. Tout comme l'acétylation de UBF par CBP (une histone méthyltransférase) accroît l'activité de l'ARNPol I. A l'inverse, l'interaction de UBF avec les protéines p53, pRb et p130 ou sa déphosphorylation impactent négativement la transcription des ADNr 45S. TOR et ERK influent positivement la transcription en phosphorylant également TIF-IA. La protéine SL1 peut également être actrice de la régulation, son acétylation par PCAF (p300/CBP-Associated Factor) induit l'activité de ARNPol I et sa déacétylation par Sir2a réprime cette activité (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt, 2003, 2010; Hannan et al., 2003; Moss, 2004).

Chez les plantes, l'activité de l'ARNPol I est aussi fortement influencée par les facteurs de croissance. Dans les années 1970, le groupe de Ricard a montré que l'activité de l'ARNPol I est stimulée dans les racines de lentilles en réponse à l'auxine (Teissere et al., 1975). Un peu plus tard, des travaux ont révélé que la cytokinine, hormone impliquée dans la croissance et la division cellulaire, induit une augmentation de la transcription des ADNr chez *A. thaliana* (Gaudino and Pikaard, 1997). Dans les années 2000, il a été démontré que la protéine CK2 est co-purifiée avec l'ARNPol I chez *Brassica oleracea* (Saez-Vasquez et al., 2001). Dans la même période, une protéine de type TOR a été décrite chez les plantes. Il a été montré que le domaine kinase de cette protéine est essentiel pour la synthèse des ADNr via son interaction directe avec le promoteur et la région 5'ETS des ADNr. Par ailleurs, la protéine ribosomale RPS6, cible de la voie TOR, est capable de modifier la structure chromatinienne des ADNr ce qui suggère un lien entre la voie TOR et la régulation de l'expression des ADNr (Kim et al., 2014; Menand et al., 2002; Ren et al., 2011)

Maturation des ADNr

La maturation des ADNr est co-transcriptionnelle dans les premières étapes de maturation du pré-90S (précurseur de la 40S) et de la pré-60S. En effet des facteurs comme le complexe U3snRNP (U3 small nucleolar RiboNucleoProtein complex ; composé du small nucleolar RNA U3, U3snRNA, et de protéines telles que la Fibrillarin, Nop56 Nop58 et Snu13) se fixent d'abord aux ADNr 45S avant de se lier au pré-ADNr 45S et entamer les processus de maturation (Henras et al., 2015; Saez-Vasquez et al., 2004).

Maturation par clivage

Chez tous les eucaryotes, la transcription des ADNr 45S/47S par l'ARNPol I donne naissance à un transcript primaire (pré-ARNr 45S ou pré-ARNr chez les plantes, 47S chez les mammifères et 35S chez la levure), contenant les séquences codant pour les ARNr matures 18S, 5,8S et 25S/28S et des séquences qui vont subir des clivages successifs, telles que les ITS1 et 2 et les 5' ETS et 3' ETS. Ces coupures et dégradations de extrémités vont être réalisées par de nombreuses endo- et exonucléases, intervenant dans un ordre précis (Figure 24). Les sites de coupure sont plus ou moins conservés entre mammifères, levure et plantes mais la plupart des acteurs diffèrent et ne sont pas tous connus (Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015).

Il semblerait que le premier événement de maturation en B_0 , dans la région 3'ETS, soit commun chez la levure et les plantes (Fatica and Tollervey, 2002; Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015). Chez la levure, c'est l'endonucléase Rnt1 qui se charge du clivage (Fatica and Tollervey, 2002; Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017), tandis que chez les plantes c'est l'activité de RTL2, une ribonucléase de type III (Comella et al., 2008; Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015).

La suite de la maturation nécessite un ou plusieurs clivages dans la région 5'ETS, dans les sites A_0 et A_1 chez la levure, A' chez les mammifères et P chez les plantes. La coupure en A_1 est réalisée par Utp24 chez la levure, et c'est le complexe U3snoRNP et la protéine Xrn2 qui participent à cette fonction pour les séquences 5' des premiers événements de clivage chez les mammifères, ni ceux impliqués dans le clivage A_0 de la levure (Fatica and Tollervey, 2002; Henras et al., 2015; Saez-Vasquez et al., 2004; Sikorski et al., 2015; Tomecki et al., 2017).

Ensuite, des événements de clivages successifs vont être réalisés, plus ou moins aux mêmes sites chez tous les eucaryotes, mais dans un ordre différent. De plus, au sein de chaque organisme, il est possible d'observer deux voies alternatives de maturation des ARNr. Par exemple chez la levure, ces deux voies amènent à la production d'un ARNr 5,8S de forme longue ou courte. Cela dépend du site clivé dans la région ITS1 : soit une coupure se fait en A_3 , forme majeure donnant le 5,8S court, soit en BL_1 , forme mineure donnant la forme 5,8S long (Fatica and Tollervey, 2002; Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017).

Chez les mammifères et les plantes, les deux voies alternatives sont déterminées par un premier événement de clivage soit dans la séquence ITS1, voie ITS1-first majoritaire, soit dans la région 5'ETS, voie 5'ETS-first minoritaire. Pour autant, chez ces organismes, les différentes voies de maturation donnent des ARNr matures identiques, ce n'est qu'après cette étape que la production d'un 5,8S long ou court est déterminée (Fatica and Tollervey, 2002; Henras et al., 2015; Sikorski et al., 2015; Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015).

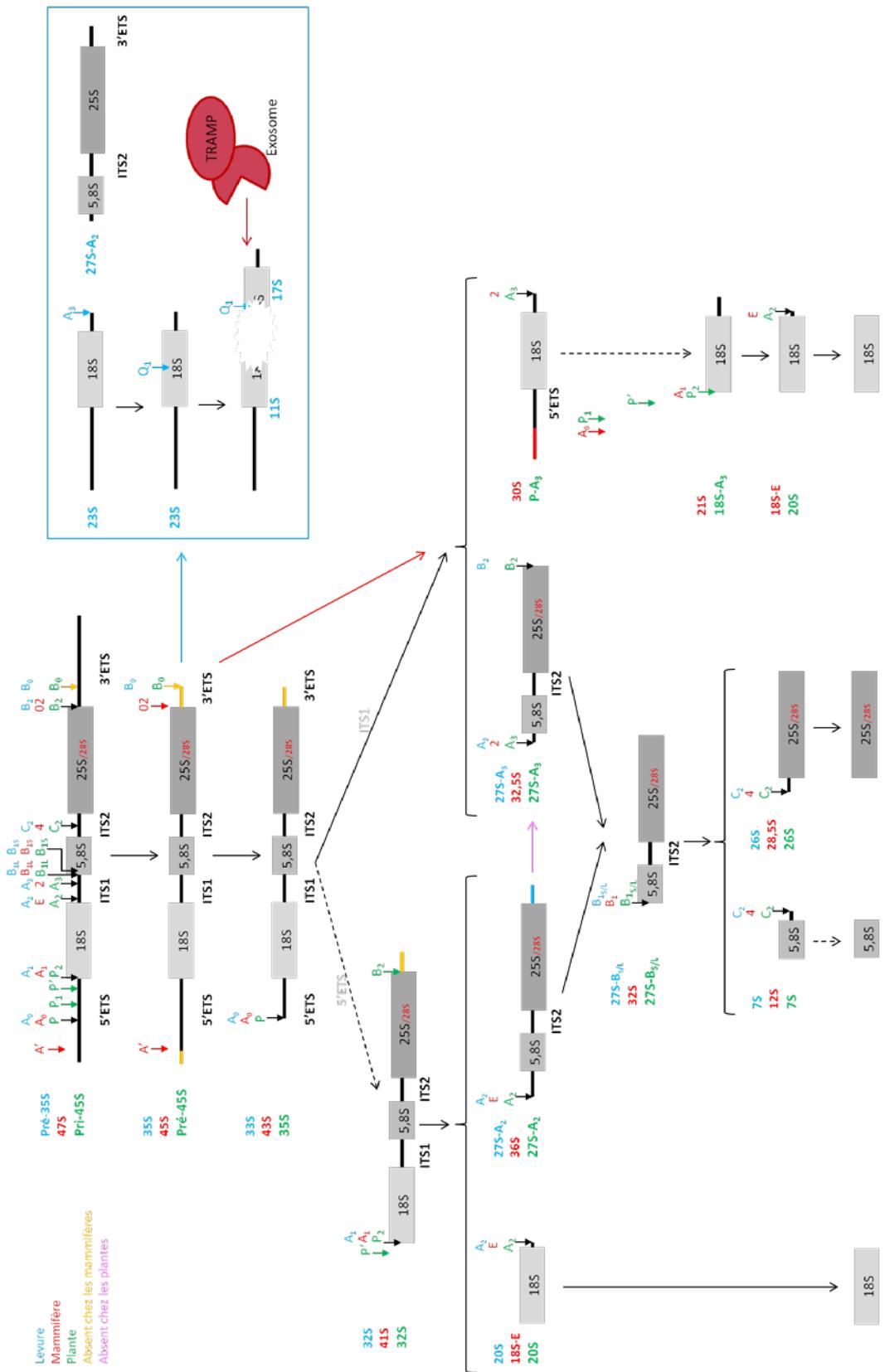


Figure 24 : S schéma s implifié d es voi es d e maturation d es ARNr chez les eucaryotes (d 'après Choueiri et al., 2018, Henras et al., 2015, Tomeki et al., 2017 et Weis et al., 2015)

Ce schéma est basé sur la maturation des ARNr chez *A. thaliana* (références notées en vert). Les formes et voies retrouvées chez la levure (bleu) et les mammifères (rouge) sont indiquées. On remarque une voie de dégradation des ARNr chez la levure en cas de coupure au site A₃ avant le site A₀.

Chez *A. thaliana*, la première maturation se fait en B₀, 3'ETS, puis au site P, 5'ETS. Ensuite la partie 3' ETS est coupée du pré-ARN par une exonucléase 3'-5', en même temps que la coupure déterminant la voie de maturation empruntée (Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015).

Dans la voie ITS1-first, majoritaire, la coupure se fait au site A₃, dans l'ITS1, donnant les formes P-A₃, le 18S flanqué des séquences en 5' et 3', et 27SA₃, contenant le 25S, le 5,8S, l'ITS2 et une séquence flanquante en 5'. Le P-A₃ subit des clivages en 5' : P₁, P' et P₂; puis en 3' pour donner le 18S mature. La dernière étape de maturation avant obtention du 18S est réalisée par la protéine Nob1.

Dans la voie 5'ETS-first, après un premier clivage au site P, d'autres coupures sont réalisées dans la région 5'ETS aux sites P' et P₂, pour donner le précurseur 32S qui contient les trois ARNr et les deux ITS. Le 32S est scindé en deux pour une coupure au site A₂, dans l'ITS1 en amont du site A₃, pour donner les formes 20S et 27SA₂. La forme 20S nécessite une maturation en 3' pour donner le 18S mature, semblable à celle réalisée dans la voie ITS1-first. Les formes 27SA₂ et A₃ vont ensuite suivre un processus similaire avec un premier clivage 5' en B₁, qui va déterminer la production d'un 5,8S long ou court. Une coupure dans l'ITS2 sépare ensuite les formes 26S (25S plus une partie de l'ITS2) et 7S (5,8S long ou court plus l'autre partie de l'ITS2). Le 26S subit une étape de clivage pour donner les 25S. Le 7S est pris en charge par l'exosome et le complexe TRAMP (contenant RRP6, RRP46 et MTR4) pour donner la forme mature 5,8S long ou court (Lange et al., 2008, 2011, 2014; Sikorski et al., 2015; Tomecki et al., 2017; Weis et al., 2015).

Maturation par modifications chimiques

Les ARNr 18S, 25S et 5,8S subissent également des modifications chimiques de manière co-transcriptionnelle et souvent avant les événements de clivage. Chez les eucaryotes, environ 2% des nucléotides des ARNr, soit 112 chez la levure et 201 chez l'homme, sont modifiés soit par des complexes de type snoRNP soit par des enzymes conventionnelles. La méthylation du ribose (sucré), 2'-O-méthylation, et la pseudouridylation de l'acide U, Ψ, sont les plus fréquentes modifications des ARNr : chez la levure environ 55 sucres méthylés et 45 Ψ, 94 2'-O-méthylation et 95 Ψ chez l'homme et environ 86 sites potentiels de 2'-O-méthylation ont été annotés chez *A. thaliana*. Les modifications 2'-O-méthylation et Ψ sont respectivement déposées par les complexes snoRNP de type C/D et H/ACA (Barneche et al., 2001; Sharma and Lafontaine, 2015).

Les complexes snoRNP (Figure 2.5) sont composés de protéines dites « cores » et d'un snoRNA (petit ARN nucléolaire, small nucleolar RNA) qui guide la modification sur un site spécifique. Les snoRNA sont des petits ARN non-codants, transcrits par les ARNPol II et III, et sont classés en deux catégories en fonction de leurs motifs : RUGAUGA correspond à la boîte C, CUGA à la boîte D ; tandis que la boîte H correspond à la séquence ANANNA, et la boîte ACA porte le nom de sa séquence. Les C/D snoRNP contiennent les protéines cores Nop58, Nop56, la protéine 15.5 (Snu13 chez la levure) et la fibrillarine (Nop1 chez la

levure), la méthyltransférase du complexe. Les complexes H /ACA sont composés de protéines NHP2, Nop10, GAR1 et de la pseudouridine synthase, la Dyskerin, Cbf5 chez la levure (Barneche et al., 2001; Brown and Shaw, 1998; Brown et al., 2003; Watkins and Bohnsack, 2012).

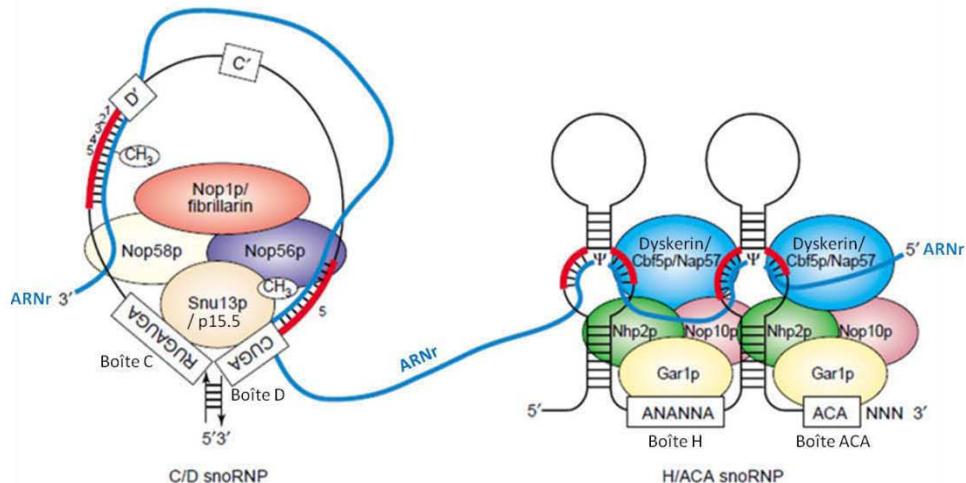


Figure 25 : Schéma des complexes snoRNP de C/D et H/ACA (de Brown et al., 2003)

Les snoRNA contiennent des boîtes qui leur sont spécifiques C/D (et C'/D') et H/ACA, leur conférant leur structure et la possibilité de se lier aux protéines spécifiques de chaque complexe : Fibrillarine, Nop 56, Nop 58 et p15.5 pour les C/D snoRNP, Dyskerin, Nhp2p, Nop10 et Gar1 pour les H/ACA snoRNP. Il s'agit quindi vers le site de modification par complémentarité de bases avec les ARNr (séquence en rouge). Les sites de modifications des ARNr sont indiqués CH₃ pour la méthylation par les snoRNP C/D et Ψ pour la pseudouridylation par les snoRNP H/ACA.

Cependant, certains complexes snoRNP ne sont pas impliqués dans la modification chimique des ARNr, mais participent néanmoins à leur maturation. C'est le cas par exemple du complexe U3snoRNP, qui est un C/D snoRNP, et ne réalise pas de 2'-O-méthylation. Pour autant, assisté par la Nucléoline, il se lie aux ADNr 45S et aux transcrits naissants des ARNr et participe aux premiers événements de clivage au site P chez *A. thaliana* (Saez-Vasquez et al., 2004; Samaha et al., 2010).

Il existe également d'autres modifications des ARNr, au niveau des bases par exemple. Les bases adénosine, guanosine et cytidine peuvent être méthylées : m⁶2A, m¹A, m⁷G et m⁵C. Les cytidines peuvent également être acétylées, ac⁴C (Sharma and Lafontaine, 2015).

Les ARNr peuvent également être oxydés en cas de stress oxydatif : par exemple dans la maladie d'Alzheimer, le fer se lie aux ARNr et les oxyde (Honda et al., 2005; Willi et al., 2018).

Ces modifications vont entraîner des changements structuraux au niveau des ARNr, qui vont se replier sur eux-mêmes. Ces structures vont ainsi permettre l'accès aux différentes enzymes nécessaires à la biogénèse des ribosomes, appelées les RBF (Ribosome Biogenesis Factors), mais aussi à l'accrochage des P. Ces modifications jouent également un rôle dans l'assemblage des sous-unités d'un ribosome fonctionnel (Sharma and Lafontaine, 2015; Watkins and Bohnsack, 2012).

Par ailleurs, les modifications comme la 2'-O-méthylation ou la pseudouridylation des ARNr peuvent changer et créer de nombreux ribosomes hétérogènes, additionnant ainsi les possibilités de modifications du ribosome et influençant sa structure et potentiellement son affinité pour la traduction des ARNm (Erales et al., 2017; Parks et al., 2018; Sloan et al., 2017).

Biogénèse / Assemblage

Le complexe pré-90S

La transcription et l'maturation des ARNr 45 S se font de manière conjointe au sein du nucléole chez les eucaryotes. En effet, la formation du pré-ribosome 90S (pré-90S), ou SSU (Small SubUnit) processome, sur le transcript naissant des ARNr a été observé il y a bientôt cinquante ans par microscopie électronique sous la forme des « Christmas tree » (Miller and Beatty, 1969). Les « petites boules » accrochées à chaque « branche » d'ARNr correspondent aux différents complexes maturant les ARNr, d'abord grossièrement assemblés en pré-90S, puis en pré-60S (Figures 14C-D et 20).

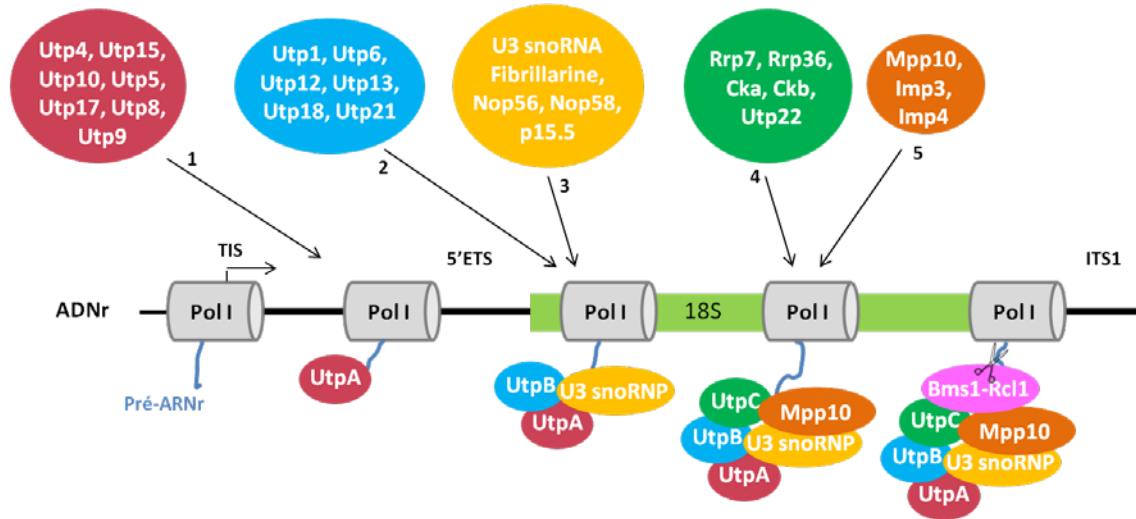


Figure 26 : Schéma de l'assemblage du 90S Processome chez les mammifères et levures

La maturation des ARNr est co-transcriptionnelle. En effet, les éléments du Processome s'assemblent sur le pré-ARNr naissant, en commençant par UtpA. Ensuite viennent UtpB et le complexe U3snoRNP. S'ajoutent ensuite UtpC puis le complexe Mpp10, qui permet le recrutement de Bms1-Rcl1 pour le clivage en ITS1.

Les protéines et ARN composant les différents complexes sont mentionnés dans les « cercles » de couleur associée.

Chez les mammifères, levures ou champignons (comme *Chaetomium thermophilum*), le pré-90S compte environ 70 RBF et une vingtaine de PR de la petite sous-unité (Kornprobst et al., 2016). Les facteurs d'assemblage sont regroupés en sous-complexes nommés UTP-A, UTP-B, UTP-C, Mpp10-Imp3-Imp4, U3snoRNP et Bms1-Rcl1 (Figure 26). C'est d'abord le module UTP-A qui se lie à la région 5'ETS, il est composé d'une dizaine de protéines Utp (U three protein). C'est au tour du module UTP-B, dénombrant également une dizaine de protéines Utp, de se lier à l'UTP-A et à la région 5'ETS des ARNr. Le complexe U3snoRNP vient ensuite s'associer à la région 5'E TS et au 18S de l'ARNr afin d'assister les premiers événements de clivage et de permettre le recrutement de UTP-C, composé des protéines Rrp7, Rrp36, Utp22, Cka et Ckb (Kornprobst et al., 2016; Kressler et al., 2017; Phipps et al., 2011). Le module Mpp10-Imp3-Imp4 se lie à l'U3 et au pré ARNr et enfin le module Bms1-Rcl1 s'associe au pré-90S pour assister la coupure au niveau de l'ITS1 et libérer le précurseur 18S (P-A₃ et 20S) accompagné de RBF et PR, formant la pré-40S (Kornprobst et al., 2016). Les RBF spécifiques au 90S (comme l'U3snoRNP, UTP-A et UTP-B) sont alors recyclés (Figure 14E) pour reformer le SSU processome sur un pré ARNr nouvellement transcrit (Kressler et al., 2017).

Chez les plantes, le complexe BoU3 (*Brassica oleracea* U3snoRNP) a été identifié. Il contient au moins 22 protéines ribosomales et des homologues de RBF contenus dans le pré-90S tels que la Fibrillarine, la Nucléoline ou Nop58 (Saez-Vasquez et al., 2004; Samaha et al., 2010; Weis et al., 2015). De plus, le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient les séquences pour la plupart des protéines Utp et des orthologues du complexe U3snoRNP. Des analyses protéomiques du nucléole ont permis d'identifier de nombreuses protéines orthologues à celles retrouvées dans le pré-90S (Kojima et al., 2007; Matsumura et al., 2016; Montacié et al., 2017; Palm et al., 2016).

Les pré-sous-unités 40S et 60S

Après la dissociation du pré-90S, le pré-40S est « lâché » dans le nucléole, il ne lui reste plus beaucoup d'étapes de maturation à ce stade. Il ne manque que l'addition de PR (RPS10 et RPS26 par exemple), une restructuration 3D ainsi que le dernier événement de clivage passant de la forme 20S à 18S, réalisé par Nob1 (Palm et al., 2018). La pré-40S va alors être exportée vers le cytoplasme (Figure 14F) grâce à des protéines de type « exportin », contenant des motifs d'exportation du noyau : NES (Nuclear Export Signal). Par exemple, l'hétérodimère Noc4-Nop14 se lie au pré-90S et reste accroché au pré-40S pour permettre son passage du nucléole au noyau (Tschochner and Hurt, 2003). Les autres acteurs de cette voie et leur mode d'action restent peu décrits à ce jour. Les derniers événements de maturation (Figure 14F) pour la formation de la sous-unité mature 40S, l'ajout des dernières RPS ainsi que le dernier clivage par Nob1 pour donner l'ARNr 18S mature, sembleraient se dérouler dans le cytoplasme chez la levure.

Mais chez *A. thaliana*, il se pourrait que le dernier clivage ait lieu dans le cytoplasme, tandis que l'ajout des dernières RPS se fera dans le noyau. Cependant, ces hypothèses restent à vérifier (Kornprobst et al., 2016; Kressler et al., 2017; Palm et al., 2018; Phipps et al., 2011; Tschochner and Hurt, 2003).

Après la coupure dans l'ITS1, de nouveaux RBF s'associent à l'ARNr 27S, et forment la pré-60S (Figure 14D). Cette pré-60S va subir de nombreuses étapes de maturation au sein du nucléole, dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme. Les premiers événements de maturation de la pré-60S font intervenir de nombreuses RNA hélicases, indiquant de forts changements dans la structure des ARNr, notamment leur repliement. Par la suite, la pré-60S « grossit » (Figure 14G) en incorporant presque la moitié des RPL qui lui sont attribuées, perd quand même quelques RBF, et intègre également le complexe 5S RNP, contenant l'ARNr 5S mature et les protéines RPL5 et RPL11. Toujours dans le nucléole, la séparation en 7S et 26S se fait par une coupure dans l'ITS2. S'en suit un recrutement de l'exosome et Mtr4 par Nop53, pour initier la maturation du 7S. Une fois dans le noyau, les complexes Rix1 et Rea1 interagissent au sein de la pré-60S, coïncident avec le repositionnement du 5S RNP dans sa conformation mature. Rea1 se détache de la pré-60S juste avant son passage dans le cytoplasme. Après export dans le cytoplasme, les RBF se détachent de la pré-60S conjointement avec l'arrivée des RPL manquantes chez la levure.

Chez les plantes, il semblerait qu'une partie des RPL manquantes s'assemblent à la pré-60S dans le noyau et que certaines viennent s'associer dans le cytoplasme (Figure 14H).

Le transport de la pré-60S fait intervenir plusieurs acteurs. Notamment l'hétérodimère Noc1-Noc2 prend en charge la pré-60S dans le nucléole, pour faire la transition entre le nucléole et le nucléoplasme, la protéine Noc3 remplace Noc1. Dans le noyau, Noc3-Noc2 est remplacé par les protéines Mtr2, Nmd3 et Xpo1 pour permettre l'export de la pré-60S dans le cytoplasme (Fatica and Tollervey, 2002; Greber, 2016; Kressler et al., 2017; Palm et al., 2018; Tschochner and Hurt, 2003; Weis et al., 2014).

Chez la levure, il a été démontré que la protéine Rli1, une protéine à cœur fer-soufre, est fortement impliquée dans la biogénèse des ribosomes. Elle participe à la maturation du pré-ARNr 7S en 5,8S. De plus Rli1 se lie à la pré-40S et à la 40S mature, participant à sa maturation et son exportation jusqu'au cytoplasme (Yarunin et al., 2005).

Des homologues de la protéine Rli1 ont également été identifiées chez *A. thaliana*, sous les noms ABCE1 et ABCE2, mais sont encore caractérisées (Balk and Pilion, 2011; Barthelme et al., 2007).

Sous-unité matures et assemblage du ribosome

Le ribosome est une entité asymétrique, composée de deux sous-unités, une petite 40S et une grande 60S. Ces deux sous-unités s'assemblent dans le cytoplasme pour former un ribosome (80S) fonctionnel, c'est-à-dire apte à la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines (Figure 14I). À la fin de la traduction, les deux sous-unités se séparent pour être réintégrées dans un nouveau cycle.

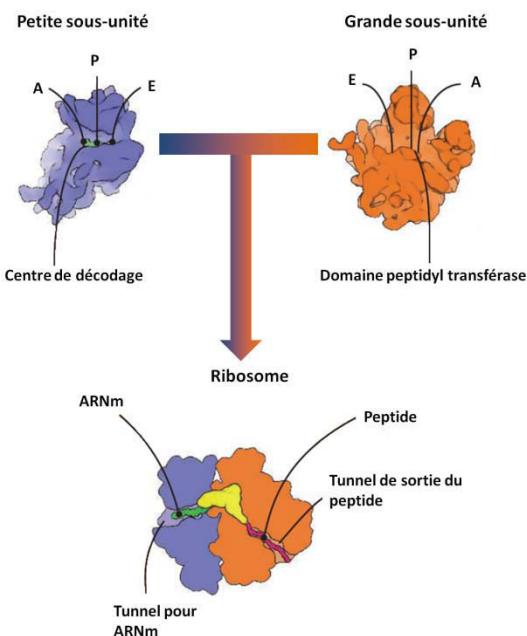


Figure 27 : Schéma d'un ribosome (d'après Melnikov et al., 2012)

La petite sous-unité 40S (bleue) contient trois domaines majeurs : le tunnel pour l'ARN messager (ARNm), le centre de décodage de l'ARNm et les sites d'accrochage des ARN de transfert (ARNt) A (entrée de l'ARNt), P (sélection de l'ARNt correspondant à la lecture de l'ARNm) et E (sortie de l'ARNt). La grande sous-unité 60S (orange) est composée du tunnel de sortie du peptide (dans lequel l'elongation de la séquence en acides aminés est réalisée), le domaine peptidyl transférase (qui comporte les acides aminés apportés par l'ARNt), et les domaines de liaison aux ARNt A, P et E.

C'est dans la petite sous-unité que l'ARNm, issu d'une transcription ARNPol II, est « décodé » en sélectionnant l'ARN de transfert (ARNt), transcrit par l'ARNPol III et correspondant au codon lu sur l'ARNm (Figure 27).

La grande sous-unité qui forme la chaîne peptidique se lie aux ARNt, qui transportent un acide aminé donné. Les peptides sont associés les uns aux autres dans le domaine PTC (Peptidyl Transferase Center) dont l'interface est majoritairement composée d'ARNr. Le ribosome est donc une ribozyme, c'est-à-dire une enzyme en ARN qui catalyse une réaction, ici le transfert de l'acide aminé porté par l'ARNt à un autre acide aminé pour former une chaîne peptidique (Cech, 2000; Melnikov et al., 2012).

Chez la levure, il a été démontré que certains ribosomes restent assemblés en 80S alors qu'ils ne sont pas actifs. C'est le cas lors de stress, comme la privation de glucose par exemple. La dissociation des deux sous-unités nécessite alors l'intervention conjointe de Dom34-Hbs1 et

Rli1 pour pouvoir être intégrées dans un cycle de traduction, lors d'un retour à des conditions de croissance favorables par exemple. S'ils ne sont pas conservés, les ribosomes sont ubiquitinylés, devenant les cibles de la dégradation par autophagie (van den Elzen et al., 2014; Lempäinen and Shore, 2009; Yarunin et al., 2005).

Chez les bactéries, les ribosomes 70S forment des dimères qui sont appelés les particules inactives 100S pendant le stress, et qui seront réactivées ensuite (Beckert et al., 2018).

Enfin, le ribosome participe activement à la régulation de l'expression génique puisque la composition du ribosome peut changer en fonction du tissu ou du développement d'un individu et ainsi « choisir » les ARNm à transcrire préférentiellement (Byrne, 2009).

OBJECTIFS

Pendant ma thèse, j'ai choisi de me concentrer sur l'impact que peuvent avoir le protéome (Partie 1) et le fer (Partie 2) nucléolaire sur la structure et les fonctions du nucléole.

Dans un premier temps j'ai voulu déterminer le protéome nucléolaire d'*Arabidopsis thaliana* dans les tissus foliaires, sachant que deux autres études du protéome nucléolaire d'*A. thaliana* ont été réalisées sur des protoplastes (Palm et al., 2016; Pendle et al., 2005). Il était donc intéressant de déterminer le contenu en protéines de nucléoles extraits à partir de celles organisées en tissu.

C'est dans ce cadre que j'ai publié mon premier article, révélant le lien entre la présence du protéasome 26S dans le nucléole, sa fonction et la structure fonctionnelle du nucléole (FC/DFC/GC), et cela constitue la Partie 1-1 de mes Résultats.

Le nucléole à 37°C chez les animaux retient des protéines induisant une déstructuration du nucléole (Audas et al., 2012a, 2012b; Jacob et al., 2013). Comme chez *A. thaliana* à 37°C, le nucléole est également dé structuré, nous avons voulu déterminer le protéome nucléolaire pendant un stress thermique à 37 °C. Ces résultats sont présentés dans la Partie 1-2 des Résultats.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à un composé chimique du nucléole, le fer. En effet, celui-ci est accumulé dans les nucléoles de plantes mais semble toxique lorsqu'il s'accumule chez les mammifères. Plus précisément, le fer induit des dommages aux ADNr et oxyde les ARNr, ce qui est lié à la maladie d'Alzheimer chez l'homme (Henle et al., 1996, 1999; Honda et al., 2005; Pietrzak et al., 2011; Quintana et al., 2006). Chez les plantes, le manque de fer entraîne la formation de ribosomes hétérogènes, par absence de certaines protéines ribosomales (Rodríguez-Celma et al., 2013; Wang et al., 2013). J'ai donc voulu vérifier si le fer peut également impacter la biogénèse des ribosomes et ARNr, chez les plantes.

Ce projet m'a permis de rédiger un deuxième article, en cours de préparation, dans lequel nous montrons que la mutation des Nicotianamine Synthase 1, 2 et 4 induit une perte du fer nucléolaire et modifie la structure fonctionnelle du nucléole ainsi que la transcription des ADNr 45S. Ces analyses constituent la Partie 2 des résultats.

Les résultats sont accompagnés d'une introduction spécifique sur le protéasome 26 S pour la Partie 1, et sur le métabolisme du fer dans la Partie 2.

RÉSULTATS

Partie 1 : Le Nucléole, son protéome et le protéasome

Le nucléole est un compartiment nucléaire non-membranaire, majoritairement connu pour son rôle dans la biogénèse des ribosomes. Il se retrouve néanmoins que le nucléole est multifonctionnel, impliqué dans de nombreux procédés cellulaires et dans la réponse aux stress environnementaux.

Par exemple, nous savons que le nucléole peut contrôler la mobilité des protéines, notamment dans des conditions de stress (Andersen et al., 2005; Boulon et al., 2010; Chamouset et al., 2010; Nalabothula et al., 2010; Tsai and Pederson, 2014). De nombreuses études ont été réalisées sur des nucléoles de cellules animales, stressées ou non, pour déterminer leur contenu en protéines (Emmott et al., 2010; Jarboui et al., 2012; Liang et al., 2012). Des études plus poussées ont permis de mettre en évidence l'implication du nucléole dans la rétention de protéines par d'autres protéines et/ou par des ARN non-codants, lors d'un stress thermique (Audas et al., 2012a; Lin et al., 2017) et (Introduction – Les autres rôles du nucléole – senseur de stress et remobilisateur des protéines).

Seulement deux études ont été réalisées chez les plantes, plus précisément chez *Arabidopsis thaliana*, pour étudier le protéome nucléolaire (Palm et al., 2016; Pendle et al., 2005). Mais ces études ont été réalisées sur des cultures de protoplastes et non pas sur des plantes entières et/ou tissus. Il était donc intéressant de déterminer le contenu en protéines de nucléoles extraits de cellules organisées en tissu.

Nous nous sommes donc proposés de réaliser le protéome de nucléoles issus de feuilles d'*A. thaliana*, 22°C et à 37°C. Les résultats de ce projet ont été publiés et constituent la Partie 1-1, dans laquelle nous démontrons un lien entre l'activité du 26S protéasome et la structure du nucléole, grâce au protéome à 22°C. Les données supplémentaires sont ajoutées après l'article, sauf les Tableaux S1 à S6 inclus (consultables sur <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01815/full#supplementary-material>).

Cette partie inclut également une présentation du protéasome 26S avant l'article. Dans la Partie 1-2, nous comparons le protéome que nous avons publié et celui que nous avons obtenu à 37°C.

Présentation du 26S Protéasome

Composition

Le 26S protéasome est un gros complexe protéique impliqué dans la dégradation des polypeptides/protéines, et très conservé entre les différents organismes tels que la levure, les mammifères ou les plantes. Il est constitué de la sous-unité catalytique (ou centre d'activité protéase) 20S (dite 20S CP, Core Protease), flanquée à chacune de ces extrémités d'une sous-unité régulatrice 19S (RP pour 19S Regulatory Particle).

La partie régulatrice 19S va reconnaître le motif ubiquitine (Ub) sur la protéine à dégrader et « dérouler » celle-ci à son entrée dans le complexe protéasome. La partie catalytique 20S s'ouvre alors pour laisser entrer le polypeptide linéarisé et procéder à sa dégradation par de nombreux clivages successifs dans la séquence, libérant des acides aminés individuels par la seconde partie régulatrice, située à l'opposé de la première (Figure 28A).

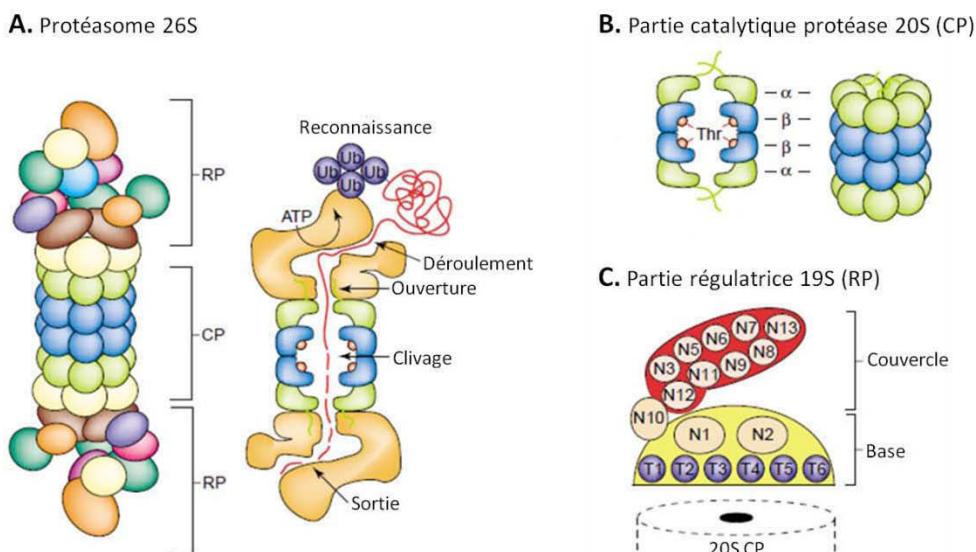


Figure 28 : Schéma du protéasome 26S (d'après Vierstra et al. 2003)

A : Le protéasome 26S est composé d'un corps catalytique d'activité protéase 20S (CP) et de deux parties régulatrices 19S (RP). La première RP reconnaît l'ubiquitination d'une protéine et la fait entrer dans le complexe en la linéarisant. La partie CP s'ouvre et coupe le polypeptide en de nombreux fragments, qui ressortent par la seconde RP.

B : La partie catalytique 20S est constituée d'anneaux α aux extrémités et de deux β au centre. Ces anneaux sont chacun constitués de 7 protéines : α₁₋₇ et β₁₋₇. Les anneaux α s'ouvrent pour laisser entrer les protéines linéaires et les β_{1,2} et β₅ se chargent du clivage au niveau du site protéase, formé par les résidus thréonines (Thr) dans leur partie N-terminale.

C : La partie régulatrice 19S comporte un couvercle et une base. La base contient les protéines RPT1 à 5 (T1-5) et RPN1, 2 et RPN10 qui font le lien entre la base et le couvercle, qui est composé des autres protéines RPN.

La partie catalytique (Figure 28B), est composée de quatre anneaux : un α, de deux β et d'un nouveau α. Chaque anneau compte 7 protéines, α_{1 à 7} et β_{1 à 7}. Les protéines α forment une sorte de porte qui s'ouvre et se ferme. L'ouverture est déclenchée par la partie régulatrice et l'arrivée d'un polypeptide linéarisé. Les protéines β₂ et β₅ possèdent des résidus thréonines sur leur extrémité N-terminale formant le site protéase, dans la chambre centrale, qui va fragmenter les protéines entrantes.

À chaque extrémité du 20S CP se trouve une partie régulatrice 19S (Figure 28C) que l'on peut diviser en deux éléments : la base et le couvercle. La base est en contact avec le 20S CP et est formée par les protéines non-ATPase RPN1, 2 et 10 ; ainsi que des protéines ATPase RPT1, 2, 3, 4, 5 et 6. Le couvercle est constitué par les autres RPN, à savoir RPN3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 13. RPN10 fait le lien entre la base et le couvercle et semble aussi être impliquée dans la reconnaissance de s protéines ubiquitinées. De même, RPN1 reconnaît les protéines ubiquitinées et participe à leur transport jusqu'au complexe 26S protéasome. Enfin, RPN11 et RPN13 possèdent une activité protéolytique qui leur permet de retirer les motifs ubiquitine des protéines adressées au protéasome (Kurepa and Smalle, 2008; Vierstra, 2003).

La voie de régulation Ubiquitine / 26S Protéasome

La voie de régulation / dégradation des protéines est servie entre les eucaryotes. Une succession d'événements faisant intervenir plusieurs enzymes est nécessaire pour la dépose de la marque post-traductionnelle ubiquitine et pour la rendre active.

L'ubiquitine (Ub) est d'abord prise en charge par une enzyme E1, enzyme d'activation de l'ubiquitine, en présence d'ATP (Figure 29). Par la suite, l'Ub activée est transférée à une enzyme de type E2, enzyme de couplage de l'Ub, qui va alors la délivrer à une enzyme E3, une Ubiquitine ligase, qui va se charger d'appliquer la marque Ub sur la protéine cible. La liaison entre la cible et la marque est réalisée par l'interaction des résidus lysines de la cible et les résidus glycine de l'Ubiquitine, à son extrémité C-terminale (Figure 29).

La protéine cible est alors adressée au protéasome, qui reconnaît les marques Ub et les retire par l'action d'enzymes de déubiquitination (DUB). La protéine cible est décompactée, linéarisée, dans le 26S protéasome et dégradée en acides aminés (aa) individuels. Les aa peuvent ainsi être réutilisés par les ARN de transfert lors de la traduction (production de protéines). Les Ub sont elles aussi disponibles pour un nouveau cycle, de leur activation à leur déposition sur une nouvelle cible.

Il arrive que les protéines cibles ubiquitinées soient déubiquitinées par des enzymes DUB avant leur adressage au 26S protéasome. Les ubiquitines libres peuvent être à nouveau fonctionnelles, et entrent de nouveau dans le cycle grâce à leur prise en charge par des enzymes de type E1 (Kurepa and Smalle, 2008; Vierstra, 2003).

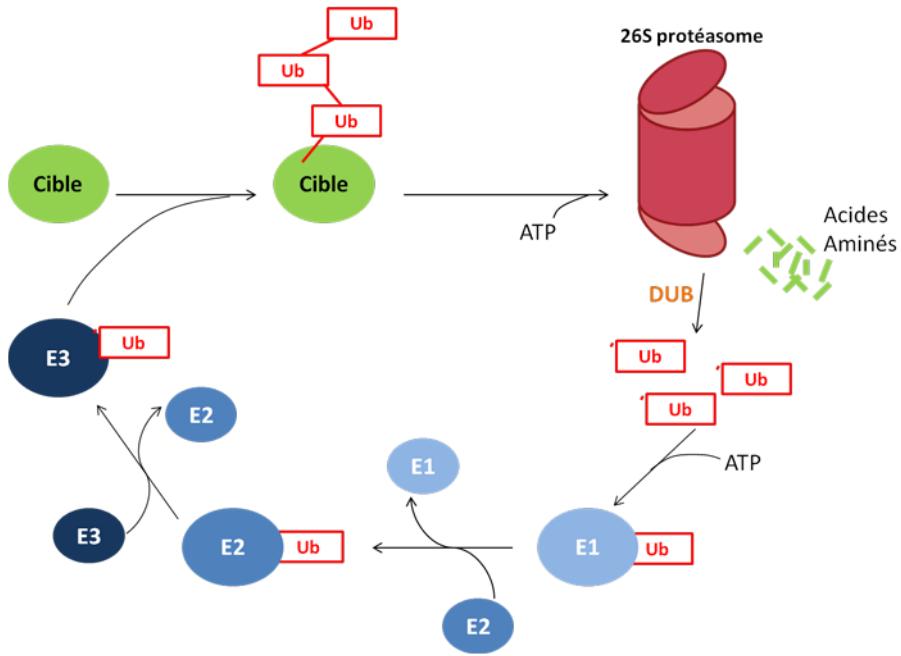


Figure 29 : La voie Ubiquitine / 26S protéasome

Une protéine cible est marquée par des ajouts d'Ubiquitine (Ub) pour être acheminée au protéasome pour dégradation. Ce processus nécessite de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). La protéine est dégradée en acides aminés individuels et les Ubiquitines sont relâchées grâce à l'action d'enzymes de déubiquitination (DUB). Les Ub sont activées par une enzyme E1, avec de l'ATP, puis prises en charge par une E2 et enfin une E3 qui les dépose sur une autre protéine cible.

Rôle de l'ubiquitine et du protéasome dans la régulation de l'expression des gènes

Chez les mammifères et la levure, les enzymes (E1, E2 et E3) réalisant l'ubiquitination des protéines cibles ainsi que des protéines du 26S protéasome sont impliquées dans la régulation épigénétique (Bach and Hegde, 2016).

En effet, l'histone H2A mono-ubiquitinée (H2AUb) est présente sur les promoteurs des gènes réprimés (contenant également la marque H3K9me2). Sa modification est réalisée par la cascade d'enzymes E1, E2, E3 sur un résidu lysine de l'histone (Berger, 2007; Endoh et al., 2012; Nakagawa and Nakayama, 2015). À l'inverse, la mono-ubiquitination de H2B (H2BUb), par les enzymes E1, E2 et E3, et/ou par l'intervention du protéasome, permet l'apposition de marques euchromatiniennes telles que H3K4me2 et H3Ac (Berger, 2007; Ezhkova and Tansey, 2004; Lee et al., 2011; Nakagawa and Nakayama, 2015).

De même, des protéines RPT (de la 19S), par exemple RPT4 et RPT6, se lient directement aux promoteurs de gènes actifs et interagissent avec certains facteurs de remodelage de la chromatine pour maintenir un état « ouvert » de la chromatine. Mais il arrive aussi que la partie régulatrice (19S) et la partie catalytique (20S) soient nécessaires pour maintenir l'état actif des gènes. D'ailleurs, le protéasome co-précipite avec l'ARNPol II et certaines des sous-unités du protéasome ont été copurifiées avec le complexe U3snRNP (Bhat and Greer, 2011; Ferdous et al., 2001; Geng and Tansey, 2012; Gillette et al., 2004; Gonzalez et al., 2002; Saez-Vasquez et al., 2004; Samaha et al., 2010; Upadhyay et al., 2012).

Protéasome et nucléole

Le 26S protéasome pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'ARNr et/ou l'RNr. On retrouve en effet de nombreuses protéines constituant le 26S protéasome dans les nucléoles des mammifères.

Chez l'homme, il contrôle l'activité transcriptionnelle de l'ARNPol I et des facteurs de la biogénèse des ribosomes (RBF) sont ubiquitinés (Arabi et al., 2003; Fátyol and Grummt, 2008; Galimberti et al., 2016; Jitsukawa et al., 2012; Latonen et al., 2011; Stavreva et al., 2006).

Par ailleurs, l'inhibition de l'activité protéasomale chez les mammifères induit une accumulation de celui-ci dans le nucléole, ainsi que de ses protéines associées. Cela peut également amener à l'accumulation dans le nucléole de facteurs de transcription induits par le stress, comme par exemple ATF4 dans le DFC et le GC (Galimberti et al., 2016), ou encore à l'accroissement de la taille du nucléole, comme dans les oocytes de porc (Arabi et al., 2003; Galimberti et al., 2016; Jitsukawa et al., 2012; Latonen et al., 2011; Mattsson et al., 2000).

Chez les animaux en cas de stress thermique à 37°C, les protéines VHL et Rpt6/Sug1 ont été identifiées dans le nucléole (Audas et al., 2012b). VHL est une E3 ligase, permettant l'application de ubiquitines sur les protéines cibles (Maniaci et al., 2017). Ces protéines possèdent des « signaux de détention nucléolaires », les NoDS.

Chez les plantes, il se pourrait également que le protéasome soit impliqué dans la biogénèse des ribosomes. En effet, comme précédemment, des protéines RPN du protéasome co-précipitent avec le complexe U3snRNP, nécessaire à la transcription et la maturation des ARNr chez *B.oleracea* (Saez-Vasquez et al., 2004; Samaha et al., 2010). La Nucléoline, une protéine majeure du nucléole et interagissant avec l'U3snRNP, co-précipite avec le 26S protéasome (Sako et al., 2014).

De plus, de nombreuses protéines du protéasome 26S ont été retrouvées dans les protéomes des nucléoles d'*A. thaliana* stressées ou non (37°C/22°C) que nous avons réalisés.

Les résultats de l'étude du protéasome sont présentés dans l'article qui suit (Partie 1-1). L'analyse comparative entre les deux protéomes nucléolaires (22/37°C) est développée en Partie 1-2.

Partie 1-1 : Article publié dans Frontiers in Plant Science :

“Nucleolar Proteome Analysis and Proteasomal Activity Assays Reveal a Link between Nucleolus and 26S Proteasome in *A. thaliana*”



Nucleolar Proteome Analysis and Proteasomal Activity Assays Reveal a Link between Nucleolus and 26S Proteasome in *A. thaliana*

Charlotte Montacié^{1,2†}, Nathalie Durut^{1,2‡}, Alison Opsomer³, Denise Palm⁴, Pascale Comella^{1,2}, Claire Picart^{1,2}, Marie-Christine Carpentier^{1,2}, Frederic Pontvianne^{1,2}, Christine Carapito³, Enrico Schleiff⁴ and Julio Sáez-Vásquez^{1,2*}

¹ Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5096, Perpignan, France, ² Laboratoire Génome et Développement des Plantes, University of Perpignan Via Domitia, UMR 5096, Perpignan, France

³ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR7178 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁴ Institute for Molecular Biosciences, Cluster of Excellence Macromolecular Complexes, Buchman Institute for Molecular Life Sciences, Goethe University Frankfurt, Frankfurt, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Munetaka Sugiyama,
University of Tokyo, Japan

Reviewed by:

Ren Maozhi,
Chongqing University, China
Sergey Morozov,
Moscow State University, Russia

*Correspondence:

Julio Sáez-Vásquez
saez@univ-perp.fr

†Present Address:

Nathalie Durut,
Gregor Mendel Institute of Molecular
Plant Biology, Austrian Academy of
Sciences, Vienna, Austria

[†]Co-first authors.

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 30 June 2017

Accepted: 06 October 2017

Published: 20 October 2017

Citation:

Montacié C, Durut N, Opsomer A,
Palm D, Comella P, Picart C,
Carpentier M-C, Pontvianne F,
Carapito C, Schleiff E and
Sáez-Vásquez J (2017) Nucleolar
Proteome Analysis and Proteasomal
Activity Assays Reveal a Link between
Nucleolus and 26S Proteasome in
A. thaliana. *Front. Plant Sci.* 8:1815.
doi: 10.3389/fpls.2017.01815

In all eukaryotic cells, the nucleolus is functionally and structurally linked to rRNA synthesis and ribosome biogenesis. This compartment contains as well factors involved in other cellular activities, but the functional interconnection between non-ribosomal activities and the nucleolus (structure and function) still remains an open question. Here, we report a novel mass spectrometry analysis of isolated nucleoli from *Arabidopsis thaliana* plants using the FANoS (Fluorescence Assisted Nucleolus Sorting) strategy. We identified many ribosome biogenesis factors (RBF) and proteins non-related with ribosome biogenesis, in agreement with the recognized multi-functionality of the nucleolus. Interestingly, we found that 26S proteasome subunits localize in the nucleolus and demonstrated that proteasome activity and nucleolus organization are intimately linked to each other. Proteasome subunits form discrete foci in the disorganized nucleolus of *nuc1.2* plants. *Nuc1.2* protein extracts display reduced proteasome activity *in vitro* compared to WT protein extracts. Remarkably, proteasome activity in *nuc1.2* is similar to proteasome activity in WT plants treated with proteasome inhibitors (MG132 or ALLN). Finally, we show that MG132 treatment induces disruption of nucleolar structures in WT but not in *nuc1.2* plants. Altogether, our data suggest a functional interconnection between nucleolus structure and proteasome activity.

Keywords: proteasome, nucleolus, *Arabidopsis*, nucleolin, FANoS

INTRODUCTION

The nucleolus is the most prominent structural and functional nuclear compartment of eukaryotic cells. The main function of the nucleolus is linked with ribosome biogenesis, intimately associated with cell metabolism, proliferation and stress response (Lam et al., 2005; Saez-Vasquez and Medina, 2008; Boulon et al., 2010; Pederson and Powell, 2015). Functional biochemical and proteomic analyses have revealed that the nucleolus is involved in other important biological processes beyond ribosome biogenesis, including RNA metabolism, gene regulation, cell cycle regulation, DNA repair

and cell aging (Pendle et al., 2005; Padeken and Heun, 2014; Tsai and Pederson, 2014; Pederson and Powell, 2015; Bensaddek et al., 2016; Palm et al., 2016). Notably the nucleolus plays a role in the cellular response to intrinsic and environmental changes as well as in genome stability and organization (Saez-Vasquez and Medina, 2008; Boulon et al., 2010; Lewinska et al., 2010; Nalabothula et al., 2010; Audas et al., 2012a; Grummt, 2013).

An important property of the nucleolus is that it sequesters a large number of nuclear genes from which RNA polymerases II and III are normally excluded and hence it might play a key role in regulating gene expression (Németh et al., 2010; Németh and Längst, 2011; Padeken and Heun, 2014; Pontvianne et al., 2016b). The nucleolus has also novel and poorly characterized functions in protein sequestering via interaction with other proteins and/or long non-coding RNAs (Audas et al., 2012a,b; Jacob et al., 2012; Lin et al., 2017). The nucleolar retention of specific proteins can potentially suppress or inhibit diverse cellular activities by recruiting general transcription or RNA processing factors or other proteins involved in protein dynamic and activities. Nucleolar sequestering may therefore directly affect post-translational protein modifications and their turnover.

In *Arabidopsis thaliana*, two proteomic studies of the nucleolus have been performed using nucleolar fractions purified from cell cultures (Pendle et al., 2005; Palm et al., 2016). The first analysis identified around 217 proteins in the nucleolus (Pendle et al., 2005). This work revealed several proteins related to the exon-junction complex as well as other non-ribosomal and even “non-nucleolar” proteins. The more recent proteome extends the initial work and identified 1602 proteins in the nucleolar fraction (Palm et al., 2016). Both studies demonstrated also nucleolar localization of spliceosomal proteins and proteins involved in non-sense mediated mRNA decay (NMD) among many others. Splicing factors have been already characterized for their role in the processing of rRNAs (Yoshikawa et al., 2011; Gupta et al., 2014), however, it is not yet known how the nucleolus might impact the activity of spliceosomal or NMD factors.

To have a more precise view of the nucleolar protein content in entire full growing plants, we isolate nucleoli from leave cells by the recently established FANoS (Pontvianne et al., 2013, 2016a). This strategy yielded the identification of most of the factors and complexes involved in rRNA transcription and processing, and in the first steps of ribosome biogenesis. In addition, we identified proteins not observed in the previous approaches using *Arabidopsis* cell cultures (Pendle et al., 2005; Palm et al., 2016). This might be linked to additional nucleolar activities in an entire and growing plant or to cell type specific variations of the nucleolar proteome.

The proteasome is a nuclear-cytoplasmic proteolytic complex involved in nearly all regulatory pathways in eukaryotic cells (Kurepa and Smalle, 2008; Collins and Goldberg, 2017). In particular, the proteasome-ubiquitin system is required for degradation of ribosomal proteins produced in excess (Sung et al., 2016b) or unassembled (Sung et al., 2016a). Furthermore, impaired proteasome function has been correlated with disease in human (Collier et al., 2017; Voutsadakis, 2017) and the stress response in plants (Gladman et al., 2016; Kang et al., 2017; Misas-Villamil et al., 2017). A functional interplay between

proteasome and nucleolar activities is in line with the integration of the nucleolus in multiple pathways and its established role as stress sensor (Boulon et al., 2010; Tsai and Pederson, 2014; Pederson and Powell, 2015). Accordingly, we show that nucleolus organization is required for optimal proteasome activity and vice-versa, that inhibition of proteasome activity affects the structure and organization of the nucleolus. The role and biological significance of proteasome subunits in the nucleolus are discussed.

RESULTS

Proteomic Analysis of the Nucleolus

We previously reported the FANoS method to purify nucleolar DNA and RNA (Pontvianne et al., 2013, 2016b; Durut et al., 2014). Here, we applied FANoS to investigate the nucleolus proteome of 3 weeks-old *Arabidopsis thaliana* plants. Two nucleoli purifications from leaves of independently grown plants were performed (exp-1 and exp-2). We obtained $\sim 9.83 \times 10^5$ and $\sim 8.25 \times 10^5$ nucleoli in exp-1 and in exp-2 respectively, and by nanoLC-MS/MS analysis, we identified 1,001 (exp-1) and 778 (exp-2) different proteins (Figure 1A and Tables S1, S2). Comparative analysis revealed that 562 proteins were consistently identified in both experimental data sets (Figure 1A and Table S3). This subset of 562 common proteins identified in both biological replicates was considered in the subsequent analysis, if not otherwise specified. 99 and 409 proteins out of these 562 proteins have been previously identified by Pendle et al. (2005) and Palm et al. (2016) respectively (Figure S1A).

Based on functional characterization and cellular localization studies reported in the literature, we determined that $\sim 35\%$ of the proteins found in nucleolus fractions have been assigned as ribosome biogenesis factors (RBF); including 45S rRNA transcription and processing factors, 90S processome, 40S and 60S assembly factors and ribosomal proteins from large (RPL) and small (RPS) ribosome subunits. $\sim 26\%$ of the 562 proteins have been described as nucleolar proteins, but not yet characterized as RBFs while the remaining 39%, to our knowledge, have not been described as nucleolar and/or having a related nucleolar function (Figure 1B). Then, we assessed in which other subcellular compartments these (562) proteins could be also (transiently or not) localized. We therefore used the subcellular protein distribution report recently published in Palm et al. (2016). We determined that $\sim 75.6\%$ of these proteins have already been reported as nucleolar components with either nucleolar, nucleolar/nuclear or nucleolar/nuclear/cytoplasmic localization revealing the highly proteomic dynamic nature of the nucleolus. $\sim 22.8\%$ were reported as nuclear or nuclear/cytoplasmic and $\sim 1.7\%$ of them were only detected in the cytoplasmic fraction. None of the proteins are localized both in the nucleolus and in the cytosol fractions (Figure S1B and Table S4).

To distinguish particular extra ribosomal biogenesis functions of the nucleolus from *Arabidopsis* leaves, we assessed the enrichment of specific categories of proteins identified in the nucleolar fractions. For that, we compared the 562

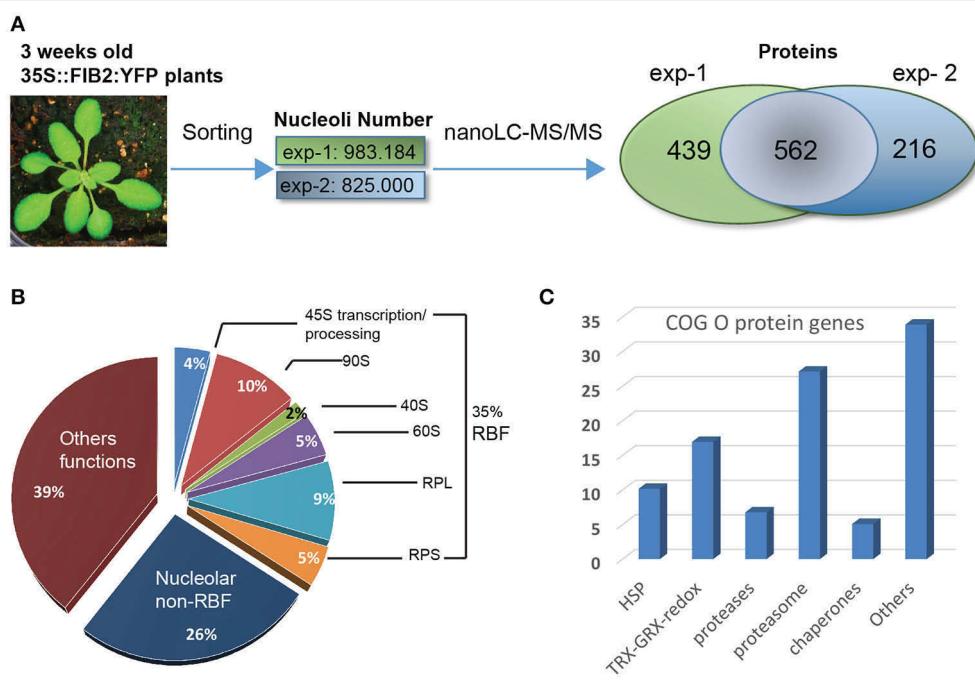


FIGURE 1 | Proteomic analysis of *A. thaliana* nucleoli. **(A)** Nucleoli extraction and nanoLC-MS/MS analysis from biological replicates: exp-1 and exp-2. From left to right: picture of a 3 week-old leaves from WT FIB2:YFP *A. thaliana*, number of sorted nucleoli per experiment and Venn Diagram showing the number of proteins identified in exp-1 (1,001), exp-2 (778), and both (562). **(B)** Pie graph shows categories of proteins found in the nucleolar fractions. Proteins are classed in three major categories: Ribosome Biogenesis Factors or RBF (35%), nucleolar non-RBF (26%) and others functions (39%). RBF are detailed in sub-categories: 45S transcription/processing (4%), 90S processome (10%), 40S (2%) and 60S (5%) assembly factors, large (9%) and small (5%) ribosome sub-units (RPL and RPS). **(C)** The histogram shows the percentage of nucleolar proteins found in the Cluster of Orthologous Group (COG) O.

protein accessions with a proteomic dataset we obtained from an *Arabidopsis thaliana* whole cell protein extract fraction (**Table S5**). For comparative purposes, the MS/MS spectrometry analysis of this fraction was performed in a similar manner to that with the nucleolar fractions. A Gene Ontology (GO) analysis revealed that in the nucleolar fractions there is an enrichment of $\sim 3.8X$ of proteins linked to ribosome biogenesis, $\sim 3.3X$ of RNA processing factors and $\sim 3.5X$ of proteins related to Ribo Nucleo Protein (RNP) Complexes compared to whole cell protein extracts (**Figure S2A**). Additionally, we performed a Cluster of Orthologous Groups (COG) analysis and four major functional categories came up (**Figure S2B**): COG J (for ribosome biogenesis structure and translation) (17%), COG A (for RNA processing and modifications) (14%), COG O (for post-translational modification, protein turn over and chaperones) (13%) and COG R (for general function prediction only) (12%). These two analyses clearly show that nucleolus of *Arabidopsis* plants is enriched in proteins linked to ribosome biogenesis, to RNA processing and modifications and to RNP complexes. The COG analysis revealed also nucleolar enrichment of proteins linked to protein dynamics. More precisely, in the COG O category, 27% of the proteins correspond to 26S proteasome subunits while the 73% of the remaining proteins include redox activities (17%), HSP (10%), proteases (7%), chaperones (5%), and others (34%) (**Figure 1C** and **Table S6**).

All together these results demonstrate that FANO\$ methodology allows to obtain purified nucleoli from *Arabidopsis* leaves for proteasome analysis. This analysis indicates that in addition to ribosome biogenesis and RNA related factors the nucleolus is enriched in proteins/factors involved in enzymatic reactions and/or gene expression regulation. Because proteasome subunits are the most abundant proteins in the post-translational modification category, protein turn over and chaperones (COG O), we decided to study the functional relevance of the nucleolar localization of these subunits of the 26S proteasome.

20S Proteasome Localization in *Arabidopsis* Protoplasts

The proteasome is a sophisticated complex that selectively degrades protein substrates marked by ubiquitin covalent linkage (Kurepa et al., 2009; Liepe et al., 2014; Bach and Hegde, 2016). The 26S proteasome complex is composed of the 19S regulatory and the 20S catalytic subunits. The 19S subunit is organized in two sub-complexes: the lid built of 8 Rpn proteins and the base composed of 3 Rpt (Regulatory Particle Non-ATPase) as well as 6 Rpt (Regulatory Particle Triple-A or Regulatory Particle Triphosphatase) proteins. The 20S subunit is built of 7 alpha and 7 beta proteins (Vierstra, 2003; Kurepa and Smalle, 2008).

Among the 562 proteins identified in our nucleolar fractions, we found components of the lid (Rpn5, Rpn7), the base (Rpt1 and Rpt5), and the alpha (α_1 , $\alpha_3\text{-}\alpha_6$) and beta (β_3 , β_5 , β_7)

subunits (**Figure S3A**, blue labeled). We also detected additional proteins from the lid (Rpn6, Rpn8, Rpn9, and Rpn11), the base (Rpn1 and 2, Rpt2, 3, and 4) and the alpha (α 2 and 7) and beta (β 1, 2, 4, and 6) subunits in the individual exp-1 or exp-2 data sets (**Figure S3A**, orange labeled). Accordingly, several of these proteins were also reported in the nucleolus proteome of *Arabidopsis* cells (Palm et al., 2016; **Table S7**). To verify to which extend proteasome subunits are localized in the nucleolus, we analyzed the subcellular localization of 20S (Rpn5a and Rpt5b) and 19S (PBC1/ β 3 and PBG1/ β 7) proteins fused to GFP in *A. thaliana* protoplasts (**Figure S3B**). We noted that nucleolar localization of Rpn5a and PBG1/ β 7 is weak and dependent on the N- or C-terminal position of the GFP, while Rpt5b and PBC1/ β 3 do not show nucleolar localization with none of the constructs, suggesting either that only a small fraction of individual “tagged” proteins are assembled into proteasome and/or that they localized transiently in the nucleolus.

20S Proteasome Localization and Activity Are Altered in *Nuc1* Mutant Plants

Therefore, to investigate a potential functional relationship between nucleolus and 26S proteasome, we determined proteasome localization and activity in *nuc1.2* mutant plants which display a complete structural disorganization of the nucleolus (Pontvianne et al., 2007). *A. thaliana* contains two nucleolin protein genes NUC1 and NUC2, previously named AtNUC-L1 and AtNUC-L2 (Pontvianne et al., 2007, 2010). *nuc1.2* plant corresponds to a T-DNA insertion mutant line described in Pontvianne et al. (2010) and Durut et al. (2014).

We first analyzed the cellular localization of proteasome subunits in *nuc1.2* mutant plants (**Figure 2**). Immunolocalization experiments revealed that, Rpn1 and Rpn10 proteins localize in the cytoplasm and mostly in the nucleoplasm of root apex from WT plants (WT panels). However, Rpn10 might also localize in nucleolar subdomains (**Figure S4**), which are reminiscent of the nucleolar cavity also called nucleolar vacuoles (Saez-Vasquez and Medina, 2008; Stepinski, 2014). Interestingly, in *nuc1.2* mutants, Rpn1 and Rpn10 proteins form discrete foci (**Figure 2**, white arrows) in the nucleolus suggesting that

localization of proteasome subunits is closely linked to the nucleolus structure.

Secondly, we performed an *in vitro* 20S proteasome activity assay using total protein extracts from WT and *nuc1.2* plants (**Figures 3A,B**). The results show that proteasome activity in *nuc1.2* (~26 RFU) is reduced compared to WT (~39 RFU) plants (**Figure 3A**). Proteasome activity measured in proteasome subunit mutant plants *rpt2* and *rpt5* does not show significant variations (~35 and ~40 RFU, respectively) when compared to WT plant extracts, in agreement with previous reports (Lee et al., 2011; Sakamoto et al., 2011). Then, we investigated 26S proteasome activity in protein extracts from WT and *nuc1.2* plants treated or not with proteasome inhibitors MG132 and ALLN (**Figure 3B**). WT plants treated with MG132 or ALLN show proteasome activity decrease (~22 RFU for each inhibitor) compared with untreated plants (~37 RFU). Remarkably, in *nuc1.2* mutants, treatment with either MG132 or ALLN inhibitors slightly reduces the proteasome activity (~21 and ~20 RFU, respectively) compared to untreated conditions (~27 RFU). Interestingly, similar proteasome activity is observed between *nuc1.2* (treated or not) and WT treated plants. These results show that *nuc1.2* is hyposensitive to proteasome inhibitors.

To verify that lower proteasome activity in *nuc1.2* protein extracts is not due to a reduced amount of proteasome protein in *nuc1.2* plants, we determined the amount of two proteasome subunits (Rpn1 and Rpn10) in WT and *nuc1.2* plants, treated or not with the MG132 inhibitor (**Figure 3C**). Western blot analysis does not reveal significant changes in protein level in WT and *nuc1.2* plants treated or not with MG132, suggesting that proteasome complex amount is not affected in *nuc1.2* plants. Similarly, we checked if NUC1 protein level could be affected by MG132 treatment. However, we do not observe detectable variations of NUC1 protein level in WT plants, suggesting that lower proteasome activity in these plants is not due to changes in the NUC1 protein level after MG132 treatment. If altered post-translational protein modifications of the 26S proteasome complex occur in *nuc1.2* plants, remains to be determined.

Because proteasome activity can be detected both in the nucleus and cytoplasm (Kurepa and Smalle, 2008), we

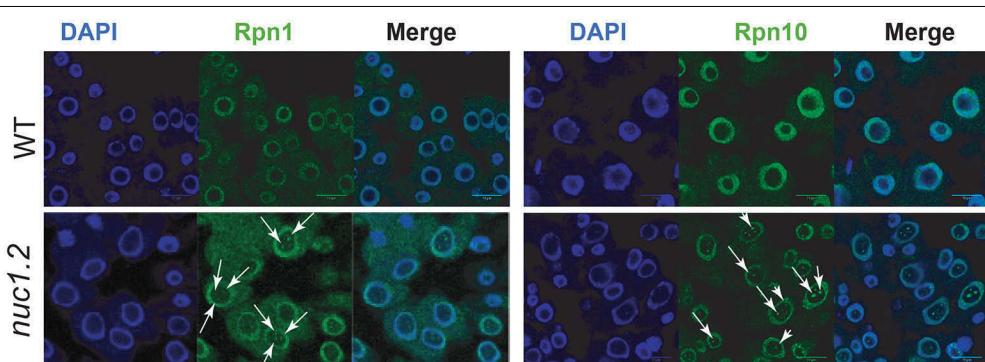


FIGURE 2 | Localization of 26S proteasome subunits in WT and *nuc1.2* plants. Immuno-localization of Rpn1a (**Left**) and Rpn10 (**Right**) proteasome protein subunits in WT and *nuc1.2* root tip cells. Arrows point foci of Rpn1a and Rpn10 proteins in nucleoli of *nuc1.2* mutant cells. DAPI staining was used to visualize nucleoplasm and distinguish the nucleolus.

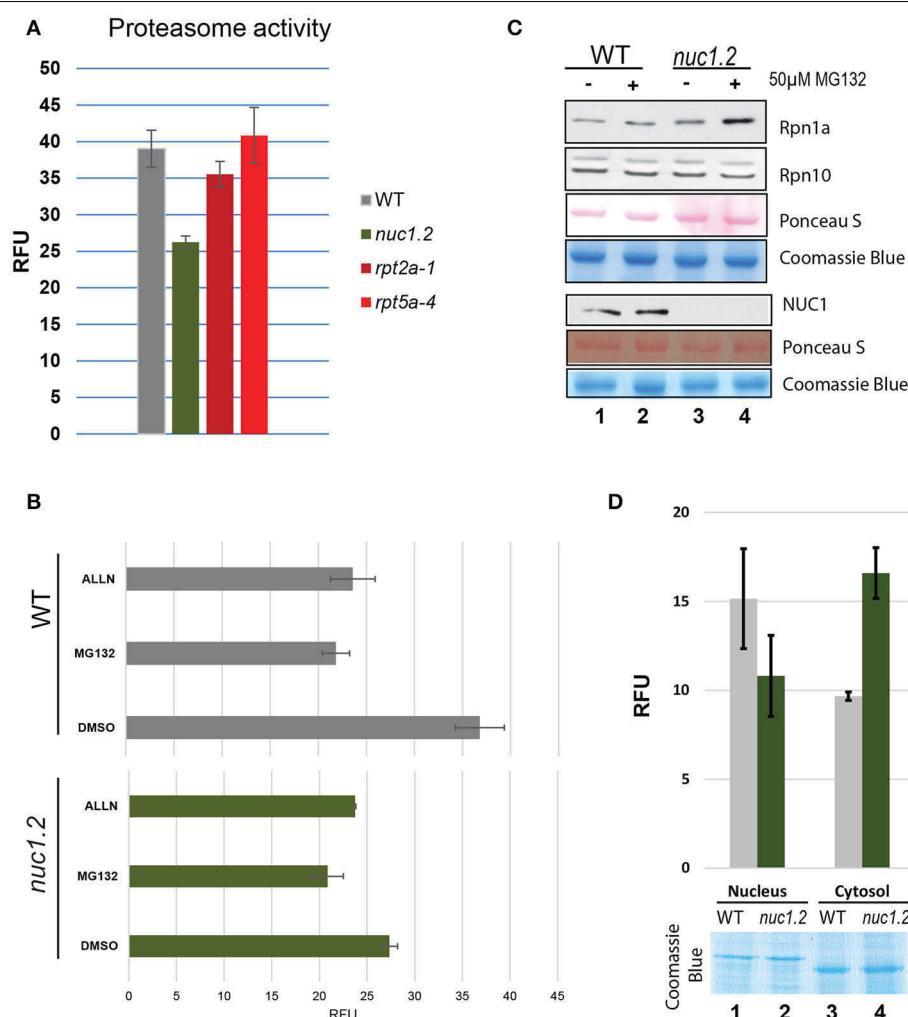


FIGURE 3 | Proteasome 26S activity in plant protein extracts. **(A)** The bar graph shows the proteasome activity in WT (gray), *nuc1.2* (green), *rpt2a-1* (dark red) and *rpt5a-4* (red) plant protein extracts. The 20S proteasome activity is shown in Relative Fluorescence Units (RFU). **(B)** Histogram of proteasome activity in WT (gray) and *nuc1.2* (green) protein extracts from plants treated with proteasome inhibitors MG132 or ALLN. Reactions without proteasome inhibitors (DMSO only) were used as control. **(C)** Western blot analysis to determine the protein level of Rpn1a and Rpn10 proteasome subunits in WT and *nuc1.2* mutant plants. Gels and membranes were stained with Coomassie blue or S- Ponceau respectively to verify similar amount of protein in each sample. **(D)** Histogram of proteasome activity in nuclear and cytoplasmic fractions from WT (gray) and *nuc1.2* (green) protein extracts. Gel was stained with Coomassie blue to verify similar amount of protein in each sample. Standard deviation of 3 independent experiments in **(A,B)** and **(D)** is indicated.

decided to determine proteasome activity in the nuclear and cytoplasmic fractions of *nuc1.2* mutant plants (Figure 3D). The results show that the proteasome activity is reduced in *nuc1.2* (~10.8 RFU) compared to WT (~15.2) plants in the nuclear fractions, while in cytosolic fractions, proteasome activity is higher in *nuc1.2* (~16.6 RFU) compared to WT (~9.7) plants. Coomassie blue staining shows similar amount of nuclear and cytosolic proteins from *nuc1.2* and WT protein fractions. Detection of H3 histone protein and absence of the cytosolic protein PRXII validates the purity of nuclear fractions (Figure S5).

Altogether these results suggest that functionally structured nucleolus and/or nucleolin protein is required for optimal proteasome dynamics and activity in plants.

Inhibition of Proteasome Activity Induces Nucleolus Disruption

It is not known if it is the absence of NUC1 protein or the nucleolar disorganization phenotype observed which is responsible of proteasome localization and/or activity previously observed in *nuc1.2* mutant plants. Thus, we analyzed if inhibition of proteasome activity could have an impact on nucleolus functional organization. Three major structures are visualized in the nucleolus: the Fibrillar Centers (FC), the Dense Fibrillary Component (DFC) and the Granular Component (GC). rRNA transcription localizes to the periphery of the FC, pre-rRNA processing initiates in the DFC and later pre-rRNA processing and ribosome assembly occurs in the GC (Raska et al., 2006; Saez-Vasquez and Medina, 2008).

We investigated nucleolar structure in response to MG132 in WT and *nuc1.2* plants expressing the Fib2:YFP nucleolar marker construct (Fibrillarin2:Yellow Fluorescent Protein) which allows to visualize nucleolus organization through the fluorescence of the YFP (**Figure 4** and Picart and Pontvianne, 2017). The green signal of the Fib2:YFP protein reveals 3 distinct states of the nucleolus in WT plants: *Structured*, in which the FC and DFC are clearly recognized, *Unstructured*, in which the FC and the DFC are practically undetectable, and *Intermediate*, where nucleoli cannot be classed in the two previous categories. These three different states are observed in both WT and *nuc1.2* plants treated or not with MG132, although the ratios are clearly different (**Figures 4A,B**). In untreated WT plants (DMSO only), ~54% of nucleoli appeared to be structured, ~17% are unstructured and ~29% are in an intermediate state (**Figure 4B**). In contrast, MG132 treatment increases the proportion of unstructured (~22%) and intermediate (~48%) nucleolus states, concomitant with a decreased proportion of structured nucleoli (~30%). In untreated *nuc1.2* mutants (DMSO only), ~9% of the nucleoli are structured, while the others present unstructured (~32%) or intermediate states (~59%), which is in agreement with previous observations (Pontvianne et al., 2007; Picart and Pontvianne, 2017). Remarkably, this analysis shows that MG132 treatment does not result in further unstructured nucleoli in *nuc1.2*, in contrast to WT plants. The fraction of structured, unstructured and intermediate states in *nuc1.2* plants treated with MG132 (~5, ~33, ~62%) remains similar to those observed in untreated plants (~9, ~32, ~59%). This result is also reminiscent to the analysis of proteasome activity in *nuc1.2* showing minimal threshold to MG132 and ALLN (**Figure 3B**).

Altogether, these data show that inhibition of proteasome activity affects nucleolus structure/organization which might impact on rRNA transcription and processing.

Proteasome Inhibition Affects Accumulation of Pre-RNA in *nuc1.2*

In all eukaryotic cells, nucleolus formation and structure depend essentially on 45S rRNA synthesis and ribosome assembly (Hannan et al., 1998; Grummt, 2003; Sáez-Vásquez and Gadal, 2010). The 45S rRNA genes (encoding 18S, 5.8S, and 25S rRNAs) are transcribed in the nucleolus by RNA polymerase I (RNA pol I) as a single precursor (or pre-rRNA) containing internal (ITS1 and ITS2) and external transcribed spacers (5'ETS and 3'ETS). Pre-rRNA processing depends on the conserved U3 small nucleolar ribonucleoprotein particle (snoRNP) containing fibrillarin and on other transiently associated proteins such as nucleolin (Turner et al., 2009; Phipps et al., 2011; Henras et al., 2015). In *Brassicaceae*, we have shown that the nucleolin-U3 snoRNP complex binds both 5'ETS rDNA and the 5'end of nascent pre-rRNA, suggesting coupling of transcription and processing of pre-rRNA (Sáez-Vásquez et al., 2004a,b). Furthermore, we demonstrated that 26S RNP subunits co-purified with the nucleolin-U3snoRNP complex suggesting that 26S proteasome might affect 45S rRNA gene expression (Samaha et al., 2010).

To investigate if 26S proteasomal activity can affect rRNA transcription and/or processing, we measured the accumulation of (1) primary pre-rRNA precursor produced by RNA Pol I and (2) processed pre-rRNA at the primary cleavage site (P) in WT and/or *nuc1.2* mutant plants treated or not with MG132 (**Figure 5**). Primer *tis* maps the transcription initiation site (TIS) (Saez-Vasquez and Pikaard, 1997) while primer *p* maps the P

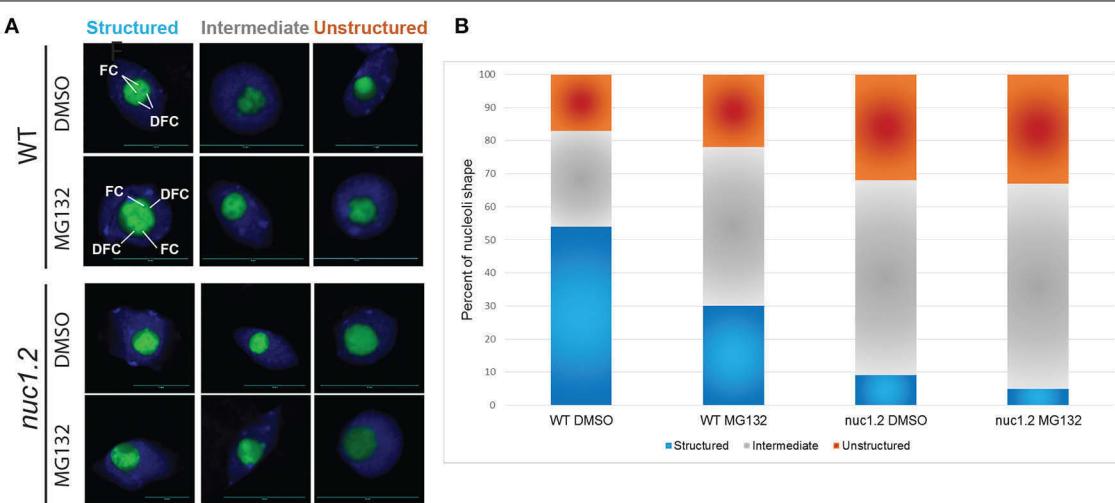
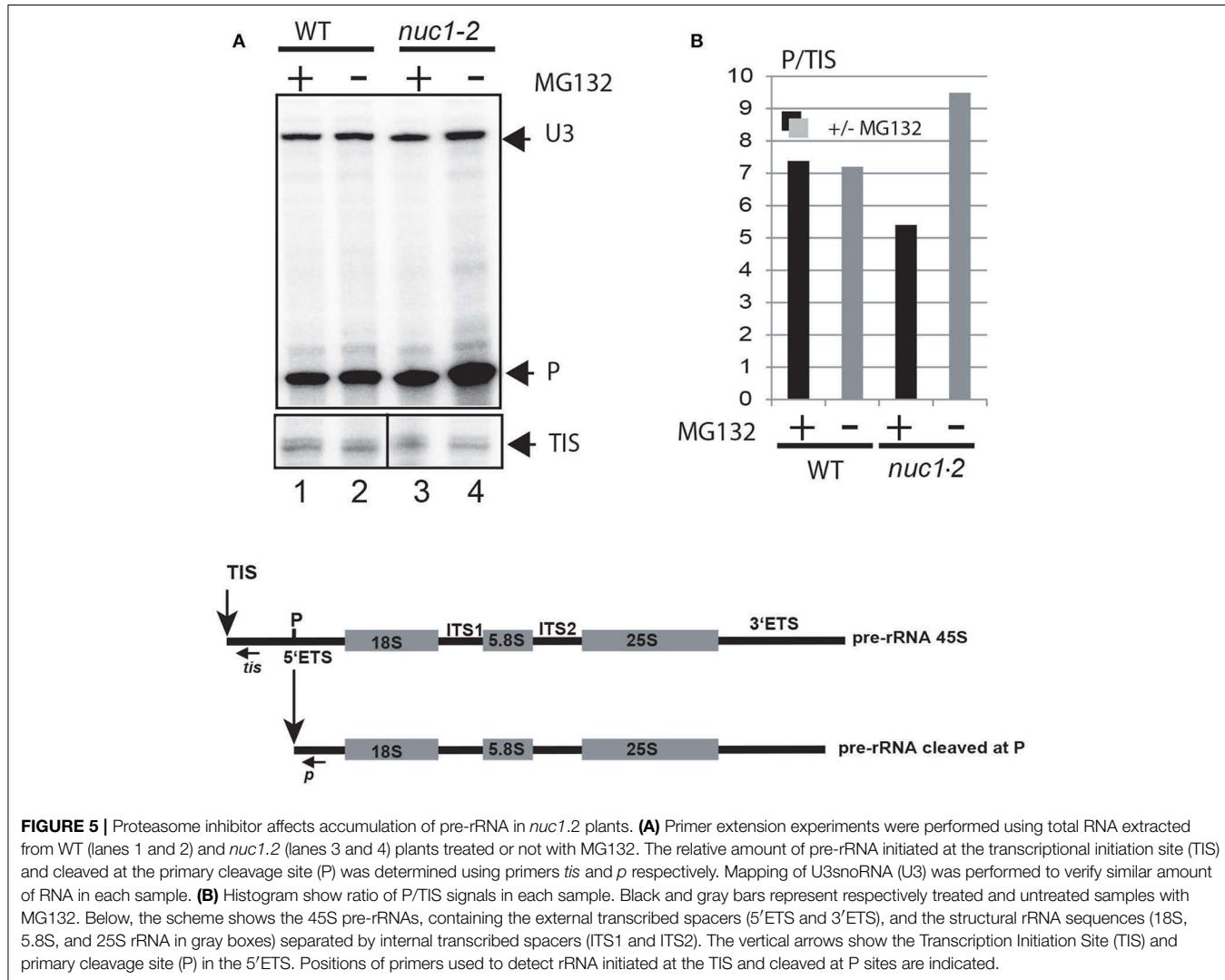


FIGURE 4 | MG132 proteasome inhibitor affects nucleolus structure. **(A)** Nucleoli from WT and *nuc1.2* plants, expressing the Fib2:YFP constructs, treated or not with 50 μ M MG132. 100 nucleoli were analyzed in each sample. Green fluorescence of the Fib2:YFP, is used to visualize nucleolus organization with the FC (Fibrillar Centers), and the DFC (Dense Fibrillary Component) components in Structured, Intermediate and Unstructured forms. DAPI staining was used to visualize nucleoplasm and distinguish the nucleolus. **(B)** The bar graph depicts the percentage of structured (blue), intermediate (gray) and unstructured (orange) nucleoli in WT and *nuc1.2* plants treated or not with 50 μ g MG132. Reactions without proteasome inhibitors (DMSO only) were used as control. 100 nuclei for each plants and conditions were analyzed. Scale bar = 10 μ m.



primary cleavage site (Sáez-Vasquez et al., 2004b). To compare the ratio between primary and cleaved pre-rRNA (TIS/P) in WT and *nuc1.2* plants (treated or not with MG132), *tis* and *p* primers were added simultaneously to the same primer extension reactions (lanes 1–4). As previously reported, we observed an accumulation of pre-rRNA precursors in the *nuc1.2* mutant compared to WT plants (Figure 5A, lanes 2 and 4), suggesting a defect in primary pre-rRNA processing in mutant plants (Pontvianne et al., 2007). Interestingly, while P/TIS ratio remains similar in WT plants treated or not with MG132, in *nuc1.2* mutants, P/TIS ratio decreases after MG132 treatment (~ 5) compared to untreated conditions (~ 9); signifying an increase of ~ 2 -fold of pre-rRNA cleaved at the P site, or alternatively a decrease of pre-rRNA initiated at the TIS, in the *nuc1.2* plants.

Altogether these observations indicate that proteasome inhibition does not affect RNA Pol I transcription or co-transcriptional cleavages of pre-rRNA, but rather later cleavages events taking place in the nucleolus. The data suggest also a role of NUC1 in proteasome activity or complex organization.

DISCUSSION

We report a proteomic analysis of the nucleolus from *Arabidopsis thaliana* leaves. We identified most of the proteins required for ribosome biogenesis, including rRNA transcription and processing factors, ribosomal proteins and assembly factors, indicating that the FANO-S strategy allows the purification of integral nucleoli for nucleolar proteomic analysis (Figure 1 and Tables S1–S4). We also reported ~ 100 new proteins not identified in previous nucleolar proteome analyses from *Arabidopsis* cell cultures (Pendle et al., 2005; Palm et al., 2016). These novel identified proteins might be cell type, tissue or development specific and they might play a role either in ribosome biogenesis or in other central functions of the nucleolus. Moreover, and in contrast to the previous studies, we obtained the nucleolar proteome from growing plants. Therefore, all signals perceived by the plants are integrated and might impact the nucleolar proteome content, as we know that the nucleolus might also function as a stress sensor (Tsai and Pederson, 2014; Pederson and Powell, 2015).

The nucleolus from *Arabidopsis* leaves contains several factors related to RNA metabolism in the nucleoplasm, in agreement with previous reports in mammalian cells (Ahmad et al., 2009; Bensaddek et al., 2016) and *Arabidopsis* protoplasts (Pendle et al., 2005; Palm et al., 2016). We showed that nucleolus from *Arabidopsis* plants contains also proteins linked to protein metabolism, especially to protein modification and turnover (**Figure 1C**, **Figure S2B** and **Tables S6, S7**). We identified proteasome subunits from the regulatory 20S and the catalytic 19S subunits in the nucleolar fractions, suggesting that 26S proteasome subunits or complexes localize in the nucleolus (**Figure 1** and **Figures S1–S3**). Protein subunits from the 26S proteasome have already been reported in the nucleolus from animal cells (Arabi et al., 2003; Fátyol and Grummt, 2008; Latonen et al., 2011; Jitsukawa et al., 2012; Galimberti et al., 2016), however the functional significance of this localization remains to be completely understood.

Even if most of the subunits of the 26S proteasome complex were identified in the nucleolus from *Arabidopsis* leaves, slight or none nucleolar localization of tested proteasome subunits were observed in roots or mesophyll protoplast nucleoli. Localization of Rpn10 in the nucleolar cavity (NoC) of WT root apical cells (**Figure S4**) is interesting. The role of these nucleolar subdomains, is not yet clear. NoC are rather characteristic of plants and appear mainly in the actively transcribing nucleoli (Saez-Vasquez and Medina, 2008; Stepinski, 2014). Other proteins showing NoC localization are the AtLa1 protein, demonstrated to bind RNA Pol III primary transcripts (Fleurdépine et al., 2007) and the AtRRP6L1, required for RNA degradation (Lange et al., 2008). In addition, small nuclear and nucleolar RNAs were also shown to localize in this nucleolar subdomain (Shaw and Brown, 2004). It would be then interesting determining more precisely nucleolar localization of the proteasome in leave cells and in other plant tissue and organs.

Nucleolar localization of 26S proteasome might be required for instance for degradation of protein factors involved in transcription and processing of rRNA and/or ribosome assembly. Earlier studies showed a direct role of proteasome in controlling RNA polymerase I transcription and the presence of ubiquitinated pre-rRNA processing factors in the nucleoli in human cells (Stavreva et al., 2006; Fátyol and Grummt, 2008). In plants, 26S proteasome subunits co-purified with the U3snRNP complex which is required for nucleolar transcription and processing of pre-rRNA (Sáez-Vasquez et al., 2004b; Samaha et al., 2010). In other hand, 26S proteasome dependent degradation of transcriptional regulator c-Myc (Arabi et al., 2003) and protein deubiquitination (Khan et al., 2015; Sun et al., 2015) in the nucleolus of mammalian cells suggest that ubiquitination/deubiquitination might regulate activity of the proteasome in the nucleolus. We cannot exclude neither the possibility that proteasome subunits in the nucleolus might also have activities non-related to proteolysis function, including transcription, DNA repair or chromatin remodeling (Tanaka, 2009).

Our results also indicate that NUC1 protein and/or a structured nucleolus is required for optimal 26S proteasome activity (**Figure 3**). Remarkably, similar 20S proteasome activities

are observed between WT plants treated with proteasome inhibitors and *nuc1.2* mutants. We do not know yet why proteasome activity is reduced in *nuc1.2* protein extracts, nonetheless this is not due to a deregulation of proteasome gene expression, because the level of proteins encoding proteasome subunits is not affected in *nuc1.2* plants (**Figure 3C**). Interestingly, we observed that the proteasome activity is lower in the nucleus, while it is higher in the cytoplasm of *nuc1.2* plants compared to the WT (**Figure 3D**). One explanation for these results could be that a putative factor might control negatively proteasome activity or assembly. In this case, in WT plants, this factor should be present in the cytoplasm and down regulates proteasomal activity. In *nuc1.2* mutant, this factor might move to the nucleus, together with the proteasomal subunits (**Figure 2**), to reduce the proteasomal activity in the nucleus with a concomitant increase in the cytoplasm. Because in whole cell extracts, proteins from nucleus and cytosol are together in a single fraction, the potential proteasome inhibitor factor could globally reduce proteasome activity. This hypothesis is in agreement with a study reporting the involvement of a proteasome inhibitor protein (PAAF1) controlling assembly/disassembly of proteasome in Hela cells (Park et al., 2005). Nevertheless, the involvement of a similar factor and its potential role on proteasome activity in plants remains to be further investigated.

In contrast, we demonstrated that proteasome subunits form discrete foci in the nucleolus of *nuc1.2* plants (**Figure 2**). Formation of these proteasome-foci might probably affect 26S proteasome assembly or potential modifications required for optimal proteasome activity. The nucleolus is involved in the confinement of nuclear proteins through interactions with long non-coding RNAs (Audas et al., 2012a) or with the ribosomal protein pNON40 (Lin et al., 2017). Thus, it is reasonable to consider that nucleolus might be involved in the regulation of proteasome assembly or activity through a RNA or protein dependent nucleolar sequestering mechanism. Likewise, we cannot exclude that reduced 26S proteasome activity observed in *nuc1.2* protein extracts is due to the absence of NUC1 protein in these plants. Indeed, NUC1 co-purifies with an affinity purified 26S proteasome complex from *Arabidopsis* plants (Sako et al., 2014), while in Hela cells nucleolin might also regulate ubiquitination/deubiquitination status of proteasome targets in response to DNA damage (Lim et al., 2015).

In mammalian cells, proteasome inhibitors induce accumulation of proteasome subunits in the nucleolus (Mattsson et al., 2001; Arabi et al., 2003), nucleolar aggregation of proteasome targets and polyadenylated RNAs (Latonen et al., 2011), increase considerably oocytes nucleolus diameter (Jitsukawa et al., 2012) and accumulation of the stress-inducible transcription factor ATF4 in the DFC and Granular Component (GC) (Galimberti et al., 2016). We showed that inhibition of 26S proteasome activity has a major impact on nucleolus organization, which is reminiscent to the nucleolus disorganization observed in *nuc1.2* mutants (**Figure 4** and Pontvianne et al., 2007) and clearly linking proteasome activity with the nucleolar localization of proteasome subunits and functional structures of the nucleolus. Interestingly, inhibition

of proteasome activity did not induce significant changes in the accumulation of 45S pre-RNA precursors transcribed by RNA pol I and/or cleaved at the P site in WT plants. In contrast, inhibition of proteasome activity in *nuc1.2* plant mutants affects these primary events. Then, it is reasonable to suggest a functional interaction of the 26S proteasome with NUC1 protein activities, since proteasome subunits and nucleolin co-purified with the nucleolin-U3snRNP complex (Samaha et al., 2010). It would be interesting to investigate how 26S proteasome activity could affect rRNA transcription and processing and more generally ribosome biogenesis to better explain the altered FC and DFC organization observed in WT after proteasome inhibition (**Figure 4**) but also under different cellular and environmental conditions that might disrupt nucleolus organization.

To conclude, we propose that nucleolar localization of the 26S proteasome is intimately linked to nucleolar activity that is connected with protein synthesis, cell growth and proliferation. Thus, we suggest that 26S proteasome localizes in the nucleolus to control ribosome biogenesis and maybe other cellular processes associated with the nucleolar functions. Nucleolar transit (of 20S or 19S particles or individual protein subunits) might be also required for specific post-translational protein modifications and hence for regulation of proteasome activity (Yedidi et al., 2016). Indeed, the regulation of 26S proteasome activity involves different mechanisms, including post-translational modifications, substitution of catalytic subunits, binding of regulatory complexes and proteasome conformational modifications (Kurepa and Smalle, 2008; Liepe et al., 2014). Investigating, the proteasome nucleolar retention mechanisms, potential proteasome modifications in the nucleolus and how the proteasome might regulate nucleolar functions should be the next steps to better understand the functional link between the nucleolus and proteasome in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Growth Conditions

All lines were derived from *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col 0) ecotype. Plants expressing Fib2:YFP nucleolar marker construct were described in Pontvianne et al. (2013) and Picart and Pontvianne (2017). The *nuc1.2*, *rpt2a-1*, and *rpt5a-4* T-DNA insertion mutant lines were reported previously in Pontvianne et al. (2007, 2010), Wang et al. (2009), Sakamoto et al. (2011). Seeds were sown either on soil or on 1X Murashige and Skoog medium (MS containing 1% sucrose) and left for 2 days at 4°C to synchronize. Plants were then grown in controlled growth chambers under a 16 h light/8 h dark cycle at 21°C for 3 weeks (FANoS) or 2 weeks (*in vitro* activity assay) or under continuous light for 14 days (Western blot). For treatment with proteasome inhibitors MG132 and ALLN (Sigma), 15-days-old plant seedlings were transferred to petri dishes containing 6 mL of liquid MS medium complemented with 50 μM MG132 and/or 50 μM ALLN for 24 h before harvesting.

Purification of Nucleolus by FANoS

Leaves (without petiole) from 3-weeks-old Fib2-YFP plants, were fixed for 20 min in 4% formaldehyde in cold Tris

buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl), and washed twice for 10 min with Tris buffer. Then, leaves were chopped with a razor blade in FACS buffer (45 mM MgCl₂, 20 mM MOPS pH7, 30 mM Sodium citrate, 0.1% TritonX-100) containing protease inhibitors (cComplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail from Roche) and filtered through a 30 μM PARTEC CellTrics membrane. Filtrates were sonicated using a Bioruptor (Diagenode) with parameters setted up as follows: three 5-min pulse ON/30-s OFF at Medium intensity. Samples were kept on ice and protected from light until sorting experiment was performed using BD FACS ARIA II (Biosciences), at the IGMM institute, Montpellier (MRI platform), and with parameters described previously in Pontvianne et al. (2016a).

Nuclear and Cytosolic Cellular Fractionation

Fifteen-days-old plant seedlings were collected, shock-frozen in liquid nitrogen and grinded in fine powder. Samples were homogenized in three volumes of Extraction buffer (20 mM HEPES/KOH, 10 mM MgCl₂, 0.5M Hexylene glycol), filtrated through a Miracloth (EMD Millipore Corporation) and a bolting cloth (Sefar AG, 31 μm). Then, Triton X-100 was added (0.5% final) and samples incubated on a rotor for 15 min at 4°C. To obtain cytosolic and nuclear fractions, whole cell extract samples were centrifuged at 1,000 g during 10 min at 4°C. The supernatant corresponds to the cytosolic fraction. The pellet was washed with 1 mL of Extraction buffer containing 0.5% Triton X-100, centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C and finally resuspended in 150 μL of Extraction buffer (supplemented with 0.5% Triton X-100). This corresponds to the nuclear fraction. For each proteasome activity assay, 1 μg of protein of each fraction was used.

Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis

Electrophoresis and in Gel Trypsin Digestion

Purified nucleoli fractions were resuspended in Laemmli buffer containing Tris HCl pH 6.8, EDTA 1 mM, 5% of βmercaptoethanol, 5% of SDS and protease inhibitors before being separated on an in-house poured 4–10% acrylamide gel. Gel was stained with Coomassie Blue and the lanes were manually cut into six bands of similar size each. Proteins in the gel slices were then reduced, alkylated and digested overnight at 37°C with modified trypsin in a 1:100 enzyme:protein ratio (Promega, Madison, USA). Peptides were extracted during 45 min with 100 μL of 60% acetonitrile, 0.1% formic acid and 15 min with a solution of 100% acetonitrile.

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analyses

LC-MS/MS analyses of nucleoli peptide extracts were performed on a NanoAcuity LC-system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Q-Exactive plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source. Mobile phase A (99.9% water and 0.1% FA) and mobile phase B (99.9% acetonitrile and 0.1%

FA) were delivered at 450 nL/min. Samples were loaded into a Symmetry C18 precolumn (0.18 × 20 mm, 5 µm particle size, Waters) over 3 min in 1% buffer B at a flow rate of 5 µL/min. This step was followed by reverse-phase separation at a flow rate of 450 nL/min using an ACQUITY UPLC® BEH130 C18 separation column (200 mm × 75 µm id, 1.7 µm particle size, Waters). Peptides were eluted using a gradient from 1 to 8% B in 2 min, from 8 to 35% B in 43 min, from 35 to 90% B in 1 min, maintained at 90% B for 5 min and the column was reconditioned at 1% B for 20 min.

The Q-Exactive plus Orbitrap instrument was operated in data dependent acquisition mode by automatically switching between full MS and consecutive MS/MS acquisitions. Survey full scan MS spectra (mass range 300–1,800) were acquired with a resolution of 70,000 at 200 m/z with an automatic gain control (AGC) fixed at 3×10^6 ions and a maximum injection time set at 50 ms. The 10 most intense peptide ions in each survey scan with a charge state ≥ 2 were selected for MS/MS fragmentation. MS/MS scans were performed at 17,500 resolution at 200 m/z with a fixed first mass at 100 m/z, AGC was fixed at 1×10^5 and the maximum injection time was set to 100 ms. Peptides were fragmented by higher-energy collisional dissociation (HCD) with a normalized collision energy set to 27. Peaks selected for fragmentation were automatically put on a dynamic exclusion list for 60 s and peptide match selection was turned on. MS data were saved in .raw file format (Thermo Fisher Scientific) using XCalibur.

LC-MS/MS Data Interpretation and Validation

Raw files were converted to .mgf peaklists using msconvert and were submitted to Mascot database searches (version 2.5.1, MatrixScience, London, UK) against an *Arabidopsis thaliana* protein sequences database downloaded from The Arabidopsis Information Resource TAIR site (TAIR10 version), common contaminants and decoy sequences were added. The concatenated database contains 70994 protein entries. Spectra were searched with a mass tolerance of 5 ppm in MS mode and 0.07 Da in MS/MS mode. One trypsin missed cleavage was tolerated. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were set as variable modifications. Identification results were imported into Proline software (<http://proline.profiproteomics.fr/>) for validation. Peptide Spectrum Matches (PSM) with pretty rank equal to one, with peptide length equal to or above seven amino acids and with a Mascot ion score above 25 were kept. False Discovery Rate was then optimized to be below 1% at PSM level.

Cloning of 26S Proteasome Subunits and Subcellular Localization in *Arabidopsis* Protoplasts

Subcellular localization was performed as described in Sommer et al. (2011) and Palm et al. (2016). In brief, the coding sequence of Rpn5a (At5g09900), Rpt5b (At1g09100), PBC1/β3 (At1g21720), and PBG1/β7 (At1g56450) genes was amplified using *Arabidopsis thaliana* cDNA and specific oligonucleotides (Table S8). Then, amplified fragments were cloned in the pRTds vector to generate C- and N-terminal GFP fusion constructs. As a nucleolar localization control, atFIB2 (At4g25630) was cloned in

front of mCherry into the same vector and co-transformed with the GFP-fusion constructs (Missbach et al., 2013).

Leaves of 4-weeks-old *Arabidopsis thaliana* plants were rubbed on K240 sandpaper and then incubated in 25 mL of extraction buffer [1% (w/v) cellulase R10, 0.3% (w/v) macerozyme in MCP (29 mM MES-KOH pH 5.6, 500 mM sorbitol, 1 mM CaCl₂)] for 2 h at 30°C to isolate protoplasts from mesophyll cells. After incubation, the released protoplasts were filtered through a 75 µm nylon mesh and underlaid with 2.5 mL of 100% (v/v) Percoll MCP (pH 5.6 containing 5 mM MES, 500 mM sorbitol, 1 mM CaCl₂). After centrifugation at 405 g for 8 min, the clear supernatant of around 20 mL was removed and the remaining protoplast fraction was mixed with the Percoll cushion, followed by overlaying with 7.5 mL 25% (v/v) Percoll in MCP and 5 mL MCP. The mixture was centrifuged at 270 g for 8 min and the green protoplast fraction between MCP and 25% (v/v) Percoll was collected in a new tube. After centrifugation at 100 g for 5 min, the protoplast pellet was diluted in MMg (5 mM MES-KOH pH 5.6, 400 mM sorbitol, 15 mM MgCl₂) to a cell number of 106 cells per mL. For transfection, 100 µL protoplasts were mixed with 10 µg pDNA per construct. 100 µL PEG-solution [40% (w/v) PEG-4000, 100 mM Ca(NO₃)₂, 400 mM sorbitol] was added to the protoplasts. After incubation for 20 min at room temperature, the reaction was stopped with K3-solution (20 mM MES-KOH pH 5.6, 400 mM sucrose, 1 mM CaCl₂, MS salts). The protoplasts were incubated over night at room temperature and under constant light condition. The expression analysis was done by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a HCX PL APO CS 40× 1.25 NA 1.25 oil objective. Transformed protoplasts (around 10 µL) were spotted on an object slide. Fluorescence was excited and detected as follows: GFP 488 nm/505–525 nm, mCherry 568 nm/580–610 nm, chlorophyll fluorescence 514 nm/650–750 nm.

Proteasome Activity Assays

Fifteen-days-old plant seedlings treated or not with MG132 or ALLN were collected, shock-frozen in liquid nitrogen and grinded in fine powder. Samples were incubated on ice in Extraction buffer (50 mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) for 30 min with vortexing steps every 10 min. Then samples were centrifuged at 22,000 g for 20 min at 4°C and supernatant recovered. Activity assay was performed using the kit “20S Proteasome Activity Assay Kit” (Chemicon® International) according to the manufacturer’s instructions. For each assay, 2 µg of protein extract was used. Fluorescence was determined using “Fluoroskan Ascent FL” (Thermo Scientific), with light excitation at 355 nm and emission at 460 nm.

Western Blot

Plant material (100 mg) treated or not with MG132, was homogenized and extracted in protein extraction buffer [50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaFluoride, 1% NP40, 0.5% Deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitors (cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail from Roche)]. Samples were cleared by centrifugation at 13,000 g for 20 min at 4°C and proteins extracted in 1X SDS-Laemmli buffer. Western

blot was performed as described previously (Durut et al., 2014) using, α -H3 (CT, pan from Millipore) α -NUC1 (Pontvianne et al., 2010), α -RPN1a (Wang et al., 2009), α -RPN10 (Lin et al., 2011), and α -PRXII (Bréhélin et al., 2003) antibodies.

Cytology Analysis

Immunofluorescence was performed on roots apex from 8 day-old seedlings as previously described in Durut et al. (2014). Briefly, treated roots were incubated overnight at 4°C with α -RPN1 (1:1,000) and α -RPN10 (1:1,000) and then with anti-rabbit coupled with Alexa 488 (1:1,000, Invitrogen), for 3 h at room temperature. Slides were then mounted in Vectashield medium containing DAPI solution. For nucleolus structural studies, 2 week-old Fib2-YFP plants (WT and *nuc1.2*, treated or not with MG132), grown on MS medium, were fixed for 20 min in 4% formaldehyde in cold Tris buffer (10 mM Tris-HCl pH7,5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) and washed twice for 10 min with Tris buffer. Then plants were chopped with a razor blade in LB01 buffer (15 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM NaEDTA, 0,5 mM spermine, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) and filtered through a 30 μ M PARTEC CellTrics membrane. Filtrates were completed with an equal volume of sorting buffer (100 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween-20, 5% sucrose, filtered through 0,45 μ m filter) before spreading on a polylysine slide. After air-drying, slides were post-fixed in 2% formaldehyde in phosphate buffer (PBS) for 5 min and washed twice with 1X PBS. Slides were mounted in Vectashield medium containing DAPI solution. Observations and imaging were performed using a confocal microscope LSM 700 from Zeiss.

Primer Extension

Total RNAs from *A. thaliana* WT and *nuc1.2* plant mutants were extracted using Trizol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Then, all samples were then treated with RQ-DNase (Promega) to eliminate contaminant genomic DNA. Primer extension analysis to detect TIS and P sites was done using 5–10 μ g of RNAs and specific 5'end labeled primers, as previously described (Sáez-Vasquez et al., 2004b; Pontvianne et al., 2007). Products of the reaction were analyzed on 8% polyacrylamide/ 7 M urea sequencing gel.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CM, ND, AO, DP, PC, and CP performed the experiments. MC analyzed data. ND took part in writing the manuscript. FP, CC, and ES supervised experiments. JS conceived, designed the study and wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank G. Istamboulie (Fluoroskan apparatus) and Myriam Boyer-Clavel (FACS experiments) for technical assistance. Maike Ruprecht for proteasome-GFP constructs. We also thank Dr. Jan S. Smalle for providing rpn1 seeds and

antibodies against Rpn1 protein, Dr. Toru Fujiwara for rpt2 and rpt5 seeds, Dr. Jean-Philippe Reichheld and Dr. Hongyong Fu for antibodies against PRXII and Rpn10 respectively. This work was supported by the CNRS, the UPVD (fellowships to CM and ND), by a grant ANR SVSE2_SUBCELIF 087217 to JS and by the DFG (SFB902) to ES.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01815/full#supplementary-material>

Figure S1 | *A. thaliana* nucleolar proteomes. **(A)** Venn diagram of *A. thaliana* of the overlaps of nucleolar proteomes from Palm et al. (2016) (blue), Pendle et al. (2005) (purple) and the present study (green). **(B)** Histogram showing the subcellular distribution of identified nucleolar proteins from *Arabidopsis* leaves according to Palm et al. (2016). Each protein can be localized in only one of the following categories: Cytosol or Nucleus or Nucleus and Cytosol or Nucleolus or Nucleolus and Cytosol or Nucleolus and Nucleus or Nucleolus and Nucleus and Cytosol.

Figure S2 | Analysis GO (Gene Ontology) and COG (Cluster of Orthologous Genes) of proteins found in the nucleolus. **(A)** The Table Shows values for the five top GO categories for proteins identified in nucleolar fractions. No, Nucleolar proteins; WCE, Whole Cell Extract proteins. *P*-values and adjusted *p*-values, obtained with a Fisher test, are provided to indicate significant enrichment of specific proteins in the nucleolus compared to proteins detected in WCE. **(B)** The bar graph shows the percentage of each COG categories of proteins identified in the nucleolus. The GO and COG analysis were performed using the website servers <http://www.genome.jp/tools/kaas/> and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> respectively.

Figure S3 | Subcellular location of 26S proteasome proteins in *A. thaliana* **(A)** Scheme of the 26S proteasome complex showing the 19S Regulatory Particle (RP) and the 20S Core Particle (CP). In blue are represented protein subunits identified in both replicates (exp-1 and exp2) and in orange protein subunits only present in one of the replicate (exp1 or exp-2). In gray are indicated protein subunits non-identified in the nucleolar fractions. **(B)** Immunolocalization of Rpn5a-GFP, GFP-Rpn5a, PBC1/ β 3-GFP, GFP-PBC1/ β 3, Rpt5b-GFP, GFP-Rpt5b, and PBG1/ β 7-GFP and GFP-PBG1/ β 7 fused proteins in protoplasts of *A. thaliana*. The green signal shows the localization of Rpn5a, PBC1/ β 3, Rpt5b, and PBG1/ β 7 proteins. The red signal shows the signal emitted by the nucleolar marker Fibrillarin fused to mCherry (Palm et al., 2016). AUF corresponds to auto fluorescence signal. Scale bar 5 μ m.

Figure S4 | Immuno-localization of Rpn10 in root tip cells from WT FIB2:YFP plants. Arrows point subnucleolar structures called nucleolar cavities (NoC). Green fluorescence of the Fib2:YFP, is used to visualize nucleolus and DAPI staining to visualize nucleoplasm.

Figure S5 | Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic protein fractions. Specific antibodies were used to detect nuclear (Histone H3) or cytoplasmic (PRXII) proteins. NUC1 detection serves to verify the absence of NUC 1 protein in *nuc1.2* mutant plants. Membrane was stained with Ponceau-S to verify similar amount of protein in each sample.

Table S1 | List of Proteins found in exp-1 nucleoli isolation.

Table S2 | List of Proteins found in exp-2 nucleoli isolation.

Table S3 | List of Proteins found in both exp-1 and exp-2.

Table S4 | Localization of proteins found in both exp-1 and exp-2.

Table S5 | List of proteins found in *A. thaliana* whole cell extracts.

Table S6 | List of proteins found in exp-1 and exp-2 and belonging to COG O.

Table S7 | 26S proteasome proteins and accessions in *A. thaliana*.

Table S8 | List of oligonucleotides used to clone CDS of Rpn5a, Rpt5b, PBC1/ β 3, and PBG1/ β 7 into pRTds vector.

REFERENCES

- Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A., and Lamond, A. I. (2009). NOPdb: nucleolar proteome database—2008 update. *Nucleic Acids Res.* 37, D181–D184. doi: 10.1093/nar/gkn804
- Arabi, A., Rustum, C., Hallberg, E., and Wright, A. P. (2003). Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *J. Cell Sci.* 116(Pt 9), 1707–1717. doi: 10.1242/jcs.00370
- Audas, T. E., Jacob, M. D., and Lee, S. (2012a). Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol. Cell* 45, 147–157. doi: 10.1016/j.molcel.2011.12.012
- Audas, T. E., Jacob, M. D., and Lee, S. (2012b). The nucleolar detention pathway: a cellular strategy for regulating molecular networks. *Cell Cycle* 11, 2059–2062. doi: 10.4161/cc.20140
- Bach, S. V., and Hegde, A. N. (2016). The proteasome and epigenetics: zooming in on histone modifications. *Biomol. Concepts* 7, 215–227. doi: 10.1515/bmc-2016-0016
- Bensaddek, D., Nicolas, A., and Lamond, A. I. (2016). Quantitative Proteomic analysis of the human nucleolus. *Methods Mol. Biol.* 1455, 249–262. doi: 10.1007/978-1-4939-3792-9_20
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., and Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol. Cell* 40, 216–227. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.024
- Bréhélin, C., Meyer, E. H., de Souris, J. P., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2003). Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol.* 132, 2045–2057. doi: 10.1104/pn.103.022533
- Collier, T. J., Kanaan, N. M., and Kordower, J. H. (2017). Aging and Parkinson's disease: different sides of the same coin? *Mov. Disord.* 32, 983–990. doi: 10.1002/mds.27037
- Collins, G. A., and Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169, 792–806. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.023
- Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., et al. (2014). A duplicated NUCLEOLIN gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 1330–1344. doi: 10.1105/tpc.114.123893
- Fátyol, K., and Grummt, I. (2008). Proteasomal ATPases are associated with rRNA: the ubiquitin proteasome system plays a direct role in RNA polymerase I transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 850–859. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.08.010
- Fleurdépine, S., Deragon, J. M., Devic, M., Guilleminot, J., and Bousquet-Antonielli, C. (2007). A bona fide La protein is required for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 35, 3306–3321. doi: 10.1093/nar/gkm200
- Galimberti, V., Kinor, N., Shav-Tal, Y., Biggiogera, M., and Bruning, A. (2016). The stress-inducible transcription factor ATF4 accumulates at specific rRNA-processing nucleolar regions after proteasome inhibition. *Eur. J. Cell Biol.* 95, 389–400. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.08.002
- Gladman, N. P., Marshall, R. S., Lee, K. H., and Vierstra, R. D. (2016). The proteasome stress regulon is controlled by a pair of NAC transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 28, 1279–1296. doi: 10.1105/tpc.15.01022
- Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* 17, 1691–1702. doi: 10.1101/gad.1098503R
- Grummt, I. (2013). The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma* 122, 487–497. doi: 10.1007/s00412-013-0430-0
- Gupta, S. K., Chikne, V., Eliaz, D., Tkacz, I. D., Naboisshchikov, I., Carmi, S., et al. (2014). Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *RNA Biol.* 11, 715–731. doi: 10.4161/rna.29143
- Hannan, K. M., Hannan, R. D., and Rothblum, L. I. (1998). Transcription by RNA polymerase I. *Front. Biosci.* 3:282. doi: 10.2741/A282
- Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., and Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6, 225–242. doi: 10.1002/wrna.1269
- Jacob, M. D., Audas, T. E., Mullineux, S. T., and Lee, S. (2012). Where no RNA polymerase has gone before: novel functional transcripts derived from the ribosomal intergenic spacer. *Nucleus* 3, 315–319. doi: 10.4161/nuc.20585
- Jitsukawa, M., Kyogoku, H., Ogushi, S., and Miyano, T. (2012). Effects of proteasome inhibitors on the nucleolar size of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 58, 162–166. doi: 10.1262/jrd.11-134A
- Kang, M., Lee, S., Abdelmageed, H., Reichert, A., Lee, H. K., Fokar, M., et al. (2017). Arabidopsis stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway. *Plant Cell Environ.* 40, 702–716. doi: 10.1111/pce.12892
- Khan, A., Giri, S., Wang, Y., Chakraborty, A., Ghosh, A. K., Anantharaman, A., et al. (2015). BEND3 represses rDNA transcription by stabilizing a NoRC component via USP21 deubiquitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 8338–8343. doi: 10.1073/pnas.1424705112
- Kurepa, J., and Smalle, J. A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90, 324–335. doi: 10.1016/j.biochi.2007.07.019
- Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., and Smalle, J. (2009). Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* 4, 924–927. doi: 10.4161/psb.4.10.9469
- Lam, Y. W., Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A. I. (2005). The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118(Pt 7), 1335–1337. doi: 10.1242/jcs.01736
- Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., et al. (2008). Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3038–3044. doi: 10.1128/MCB.02064-07
- Latonen, L., Moore, H. M., Bai, B., Jäämaa, S., and Laiho, M. (2011). Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* 30, 790–805. doi: 10.1038/onc.2010.469
- Lee, K. H., Minami, A., Marshall, R. S., Book, A. J., Farmer, L. M., Walker, J. M., et al. (2011). The RPT2 subunit of the 26S proteasome directs complex assembly, histone dynamics, and gametophyte and sporophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 4298–4317. doi: 10.1105/tpc.111.089482
- Lewinska, A., Wnuk, M., Grzelak, A., and Bartosz, G. (2010). Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep.* 15, 87–96. doi: 10.1179/174329210X12650506623366
- Liepe, J., Holzhutter, H. G., Kloetzel, P. M., Stumpf, M. P., and Mishto, M. (2014). Modelling proteasome and proteasome regulator activities. *Biomolecules* 4, 585–599. doi: 10.3390/biom4020585
- Lim, K. H., Park, J. J., Gu, B. H., Kim, J. O., Park, S. G., and Baek, K. H. (2015). HAUSP-nucleolin interaction is regulated by p53-Mdm2 complex in response to DNA damage response. *Sci. Rep.* 5:12793. doi: 10.1038/srep12793
- Lin, Y. L., Sung, S. C., Tsai, H. L., Yu, T. T., Radjacommare, R., Usharani, R., et al. (2011). The defective proteasome but not substrate recognition function is responsible for the null phenotypes of the Arabidopsis proteasome subunit RPN10. *Plant Cell* 23, 2754–2773. doi: 10.1105/tpc.111.086702
- Lin, Y. M., Chu, P. H., Li, Y. Z., and Ouyang, P. (2017). Ribosomal protein pNO40 mediates nucleolar sequestration of SR family splicing factors and its overexpression impairs mRNA metabolism. *Cell. Signal.* 32, 12–23. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.010
- Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Klein, G., and Székely, L. (2001). Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1012–1017. doi: 10.1073/pnas.98.3.1012
- Misas-Villamil, J. C., van der Burgh, A. M., Grosse-Holz, F., Bach-Pages, M., Kovacs, J., Kaschani, F., et al. (2017). Subunit-selective proteasome activity profiling uncovers uncoupled proteasome subunit activities during bacterial infections. *Plant J.* 90, 418–430. doi: 10.1111/tpj.13494
- Missbach, S., Weis, B. L., Martin, R., Simm, S., Bohnsack, M. T., and Schleiff, E. (2013). 40S ribosome biogenesis co-factors are essential for gametophyte and embryo development. *PLoS ONE* 8:e54084. doi: 10.1371/journal.pone.0054084
- Nalabothula, N., Indig, F. E., and Carrier, F. (2010). The Nucleolus takes control of protein trafficking under cellular stress. *Mol. Cell. Pharmacol.* 2, 203–212.
- Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Peterfia, B., et al. (2010). Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* 6:e1000889. doi: 10.1371/journal.pgen.1000889
- Németh, A., and Längst, G. (2011). Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet.* 27, 149–156. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.002

- Padeken, J., and Heun, P. (2014). Nucleolus and nuclear periphery: velcro for heterochromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28, 54–60. doi: 10.1016/j.celb.2014.03.001
- Palm, D., Simm, S., Darm, K., Weis, B. L., Ruprecht, M., Schleiff, E., et al. (2016). Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol.* 13, 441–454. doi: 10.1080/15476286.2016.1154252
- Park, Y., Hwang, Y. P., Lee, J. S., Seo, S. H., Yoon, S. K., and Yoon, J. B. (2005). Proteasomal ATPase-associated factor 1 negatively regulates proteasome activity by interacting with proteasomal ATPases. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3842–3853. doi: 10.1128/MCB.25.9.3842-3853.2005
- Pederson, T., and Powell, K. (2015). Thoru Pederson: spotting novel roles for the nucleolus. *J. Cell Biol.* 208, 384–385. doi: 10.1083/jcb.2084pi
- Pendle, A. F., Clark, G. P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y. W., Andersen, J., et al. (2005). Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol. Biol. Cell* 16, 260–269. doi: 10.1091/mbc.E04-09-0791
- Phipps, K. R., Charette, J., and Baserga, S. J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 1–21. doi: 10.1002/wrna.57
- Picart, C., and Pontvianne, F. (2017). Plant nucleolar DNA: green light shed on the role of nucleolin in genome organization. *Nucleus* 8, 11–16. doi: 10.1080/19491034.2016.1236167
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., et al. (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 6:e1001225. doi: 10.1371/journal.pgen.1001225
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Mozgová, I., Hassel, C., Pontes, O. M., et al. (2013). Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev.* 27, 1545–1550. doi: 10.1101/gad.221648.113
- Pontvianne, F., Boyer-Clavel, M., and Saez-Vasquez, J. (2016a). Fluorescence-activated nucleolus sorting in arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 1455, 203–211. doi: 10.1007/978-1-4939-3792-9_15
- Pontvianne, F., Carpentier, M. C., Durut, N., Pavlišová, V., Jaške, K., Schorová, Š., et al. (2016b). Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals a role for the nucleolus in 3D organization of the *A. thaliana* Genome. *Cell Rep.* 16, 1574–1587. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.016
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F. J., Echeverria, M., et al. (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* 18, 369–379. doi: 10.1091/mbc.E06-08-0751
- Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 325–334. doi: 10.1016/j.celb.2006.04.008
- Sáez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverria, M. (2004a). Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt 4), 578–580. doi: 10.1042/BST0320578
- Sáez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverria, M. (2004b). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7284–7297. doi: 10.1128/MCB.24.16.7284-7297.2004
- Sáez-Vásquez, J., and Gadal, O. (2010). Genome organization and function: a view from yeast and Arabidopsis. *Mol. Plant* 3, 678–690. doi: 10.1093/mp/ssq034
- Saez-Vasquez, J., and Medina, F. J. (2008). “The plant nucleolus,” in *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol. 47, eds J.-C. Kader and M. Delseny (San Diego, CA: Elsevier Academic Press Inc.), 1–46.
- Saez-Vasquez, J., and Pikaard, C. S. (1997). Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11869–11874. doi: 10.1073/pnas.94.22.11869
- Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M., and Fujiwara, T. (2011). *Arabidopsis thaliana* 26S proteasome subunits RPT2a and RPT5a are crucial for zinc deficiency-tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 561–567. doi: 10.1271/bbb.100794
- Sako, K., Yanagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., Seki, M., Fujiwara, M., et al. (2014). Proteomic analysis of the 26S proteasome reveals its direct interaction with transit peptides of plastid protein precursors for their degradation. *J. Proteome Res.* 13, 3223–3230. doi: 10.1021/pr401245g
- Samaha, H., Delorme, V., Pontvianne, F., Cooke, R., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., et al. (2010). Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a *Brassica oleracea* RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant J.* 61, 383–398. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04061.x
- Shaw, P. J., and Brown, J. W. (2004). Plant nuclear bodies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 614–620. doi: 10.1016/j.pbi.2004.09.011
- Sommer, M. S., Daum, B., Gross, L. E., Weis, B. L., Mirus, O., Abram, L., et al. (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13841–13846. doi: 10.1073/pnas.1108626108
- Stavreva, D. A., Kawasaki, M., Dundr, M., Koberna, K., Muller, W. G., Tsujimura-Takahashi, T., et al. (2006). Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5131–5145. doi: 10.1128/MCB.02227-05
- Stepinski, D. (2014). Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* 251, 1285–1306. doi: 10.1007/s00709-014-0648-6
- Sun, X. X., He, X., Yin, L., Komada, M., Sears, R. C., and Dai, M. S. (2015). The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 3734–3739. doi: 10.1073/pnas.1411713112
- Sung, M. K., Porras-Yakushi, T. R., Reitsma, J. M., Huber, F. M., Sweredoski, M. J., Hoelz, A., et al. (2016a). A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife* 5:e19105. doi: 10.7554/eLife.19105
- Sung, M. K., Reitsma, J. M., Sweredoski, M. J., Hess, S., and Deshaies, R. J. (2016b). Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell* 27, 2642–2652. doi: 10.1091/mbc.E16-05-0290
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85, 12–36. doi: 10.2183/pjab.85.12
- Tsai, R. Y., and Pederson, T. (2014). Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB J.* 28, 3290–3296. doi: 10.1096/fj.14-254680
- Turner, A. J., Knox, A. A., Prieto, J. L., McStay, B., and Watkins, N. J. (2009). A novel SSU processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5 and DBP4. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3007–3017. doi: 10.1128/MCB.00029-09
- Vierstra, R. D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* 8, 135–142. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00014-1
- Voutsadakis, I. A. (2017). Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells. *Tumour Biol.* 39:1010428317692248. doi: 10.1177/1010428317692248
- Wang, S., Kurepa, J., and Smalle, J. A. (2009). The *Arabidopsis* 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant Cell Physiol.* 50, 1721–1725. doi: 10.1093/pcp/pcp105
- Yedidi, R. S., Fatehi, A. K., and Enenkel, C. (2016). Proteasome dynamics between proliferation and quiescence stages of *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 497–512. doi: 10.1080/10409238.2016.1230087
- Yoshikawa, H., Komatsu, W., Hayano, T., Miura, Y., Homma, K., Izumikawa, K., et al. (2011). Splicing factor 2-associated protein p32 participates in ribosome biogenesis by regulating the binding of Nop52 and fibrillarin to preribosome particles. *Mol. Cell. Proteomics* 10:M110.006148. doi: 10.1074/mcp.M110.006148
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- The handling Editor declared a past co-authorship with one of the authors JS, and states that the process met the standards of a fair and objective review.
- Copyright © 2017 Montacié, Durut, Opsomer, Palm, Comella, Picart, Carpentier, Pontvianne, Caparito, Schleiff and Sáez-Vásquez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Figure S1 : *A. thaliana* nucleolar proteomes

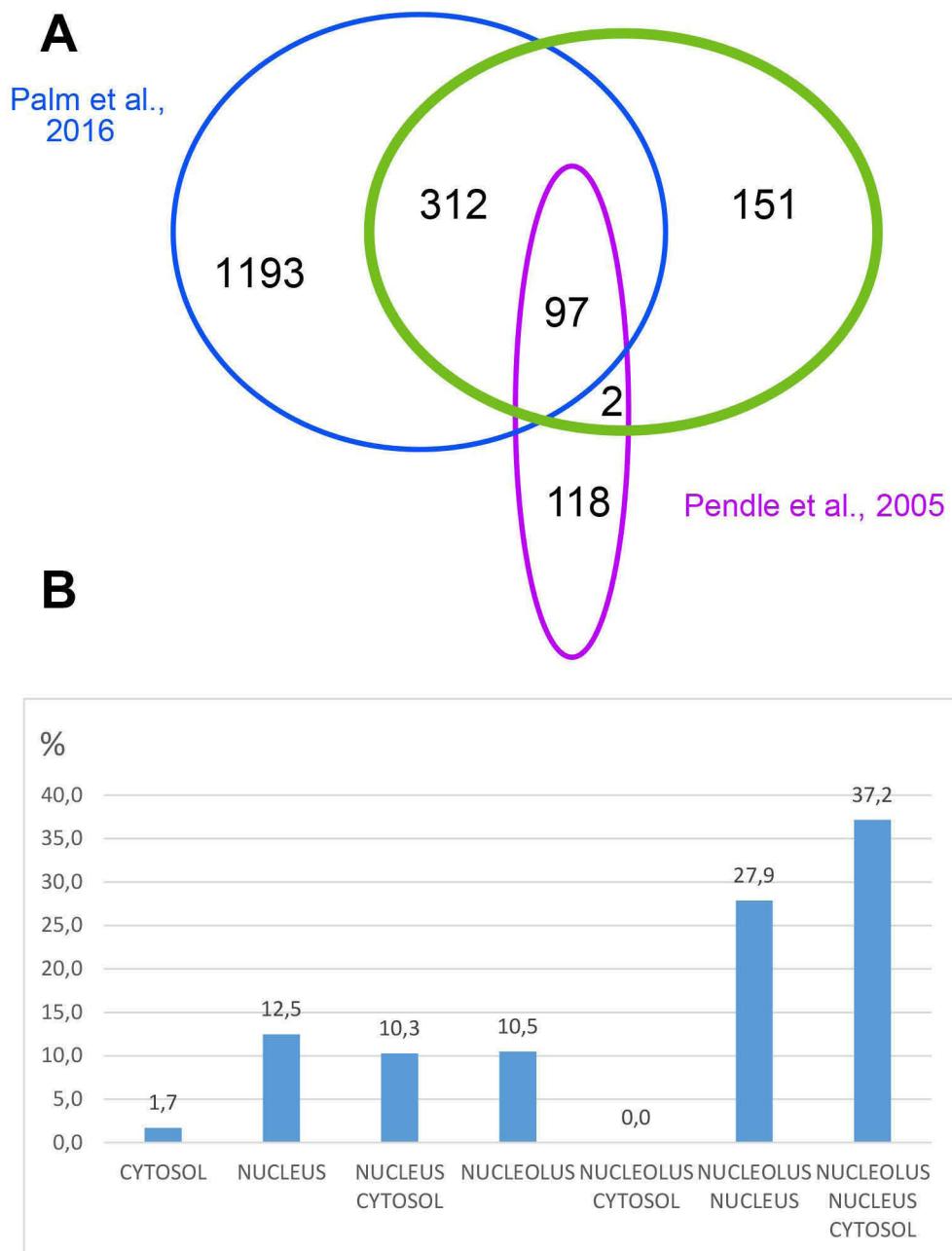


Figure S2 : Analysis GO (Gene Ontology) and COG (Cluster of Orthologous Genes) of proteins found in the nucleolus

A

Significant_go_biological_process_propagated

#term	Nucleolar (%)	WCE (%)	pvalue	adj_pvalue	WCE/No
RNA processing(GO:0006396)	25,09	7,51	3,91E-30	6,07E-27	3,34087883
ribosome biogenesis(GO:0042254)	19,93	5,26	5,30E-27	2,06E-24	3,78897338
ribonucleoprotein complex biogenesis(GO:0022613)	20,28	5,77	2,01E-25	6,24E-23	3,51473137
nucleobase-containing compound biosynthetic process(GO:0034654)	20,64	9,93	8,34E-12	6,81E-10	2,07854985
generation of precursor metabolites and energy(GO:0006091)	22,95	12,41	3,94E-10	2,66E-08	1,84931507

B

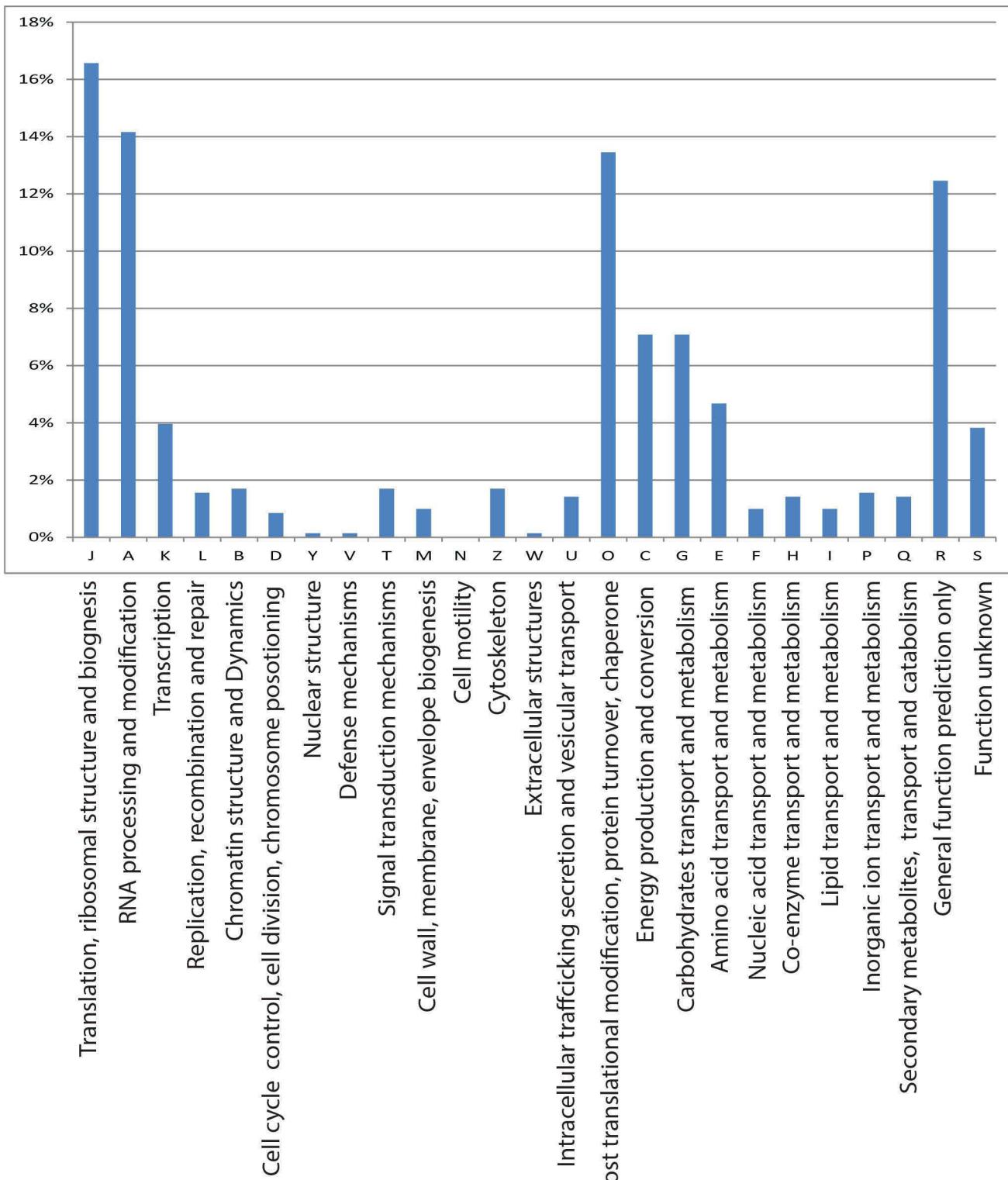


Figure S3 : Subcellular location of 26S proteasome proteins in *A. thaliana*

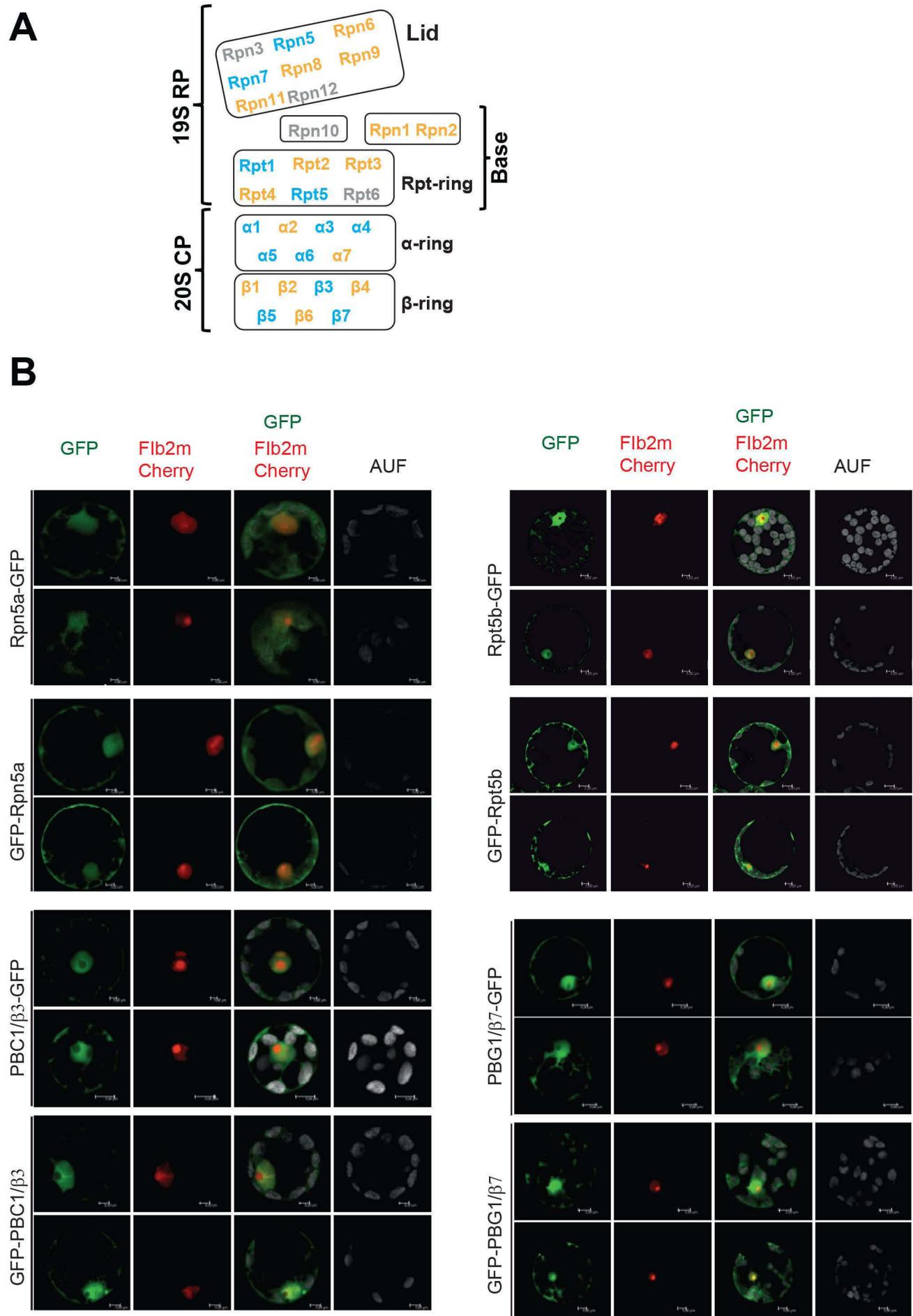


Figure S4 : Immuno-localization of Rpn10 in root tip cells from WT Fib2:YFP plants

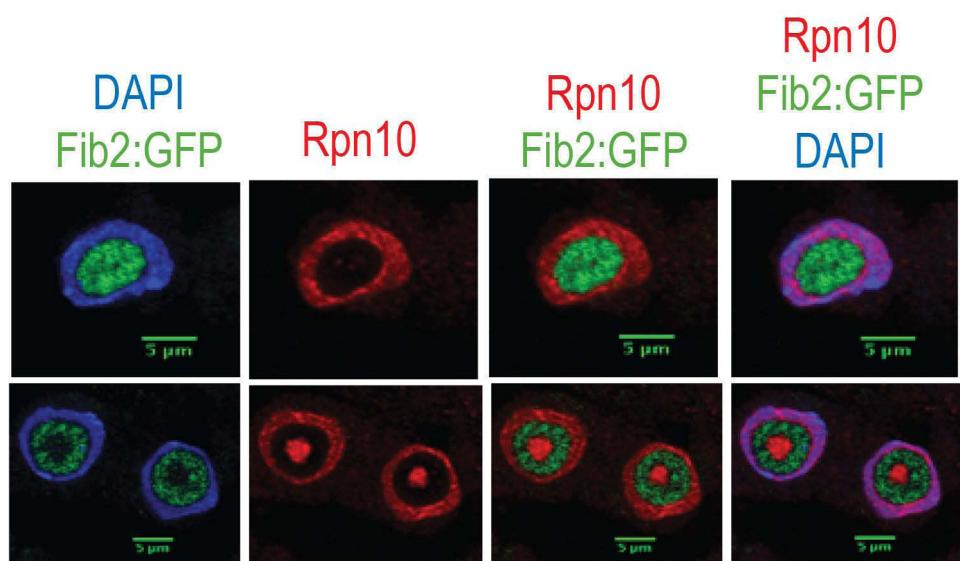


Figure S5 : Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic protein fractions

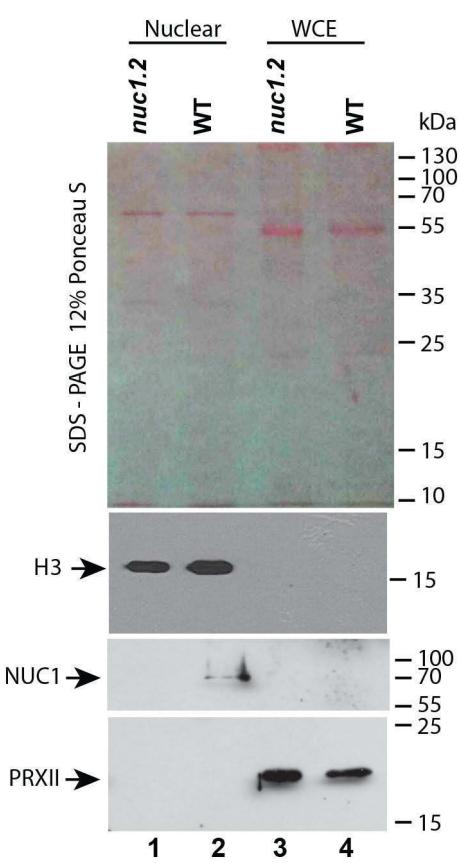


Table S7 : 26S proteasome proteins and accessions in *A. thaliana*

Nomenclature*	Name	Accession	Localization**
20S (CP) α subunits			
α1	PAA1	AT5G35590	CyNu
α2	PAB1 (1)	AT1G16470	Nu
α3	PAC1	AT3G22110	CyNuNo
α4	PAD1	AT3G51260	CyNuNo
α5	PAE1	AT1G53850	CyNuNo
α6	PAF2	AT1G47250	CyNu
α7	PAG1 (1)	AT2G27020	CyNu
20S (CP) β subunits			
β1	PBA1 (2)	AT4G31300	NuNo
β2	PBB1 (2)	AT3G27430	NuNo
β3	PBC1	AT1G21720	CyNu
β4	PBD1 (2)	AT3G22630	CyNu
β5	PBE1	AT1G13060	CyNuNo
β6	PBF1 (2)	AT3G60820	CyNu
β7	PBG1	AT1G56450	CyNu
19S (RP) subunits			
RPT1	RPT1a	AT1G53750	CyNu
RPT2	RPT2b (2)	AT2G20140	Nu
RPT3	RPT3 (2)	AT5G58290	CyNu
RPT4	RPT4b (2)	AT1G45000	CyNu
RPT5	RPT5b	AT1G09100	nf
RPT6	nf		
RPN1	RPN1a (1)	AT2G20580	CyNuNo
RPN2	RPN2b (2)	AT2G32730	CyNu
RPN3	nf		
RPN5	RPN5a	AT5G09900	Nu
RPN6	RPN6 (2)	AT1G29150	CyNu
RPN7	RPN7	AT4G24820	CyNuNo
RPN8	RPN8a (2)	AT5G05780	Nu
RPN9	RPN9a (2)	AT5G45620	Nu
RPN10	RPN9b(2)	AT4G19006	Nu
RPN11	nf		
RPN11	RPN11(2)	AT5G23540	CyNuNo
RPN12	nf		

Proteins found in exp-1 and exp-2, in exp-1 (1), in exp-2 (2) or not found (nf) are indicated.

The cytosolic (Cy), nuclear (Nu) and/or nucleolar (No) cellular localization is mentioned.

Asterisks indicate nomenclature* and cellular localization** according to (Kurepa and Smalle, 2008) and (Palm et al., 2016) respectively.

Table S8 : List of oligonucleotides used to clone CDS of Rpn5a, Rpt5b, PBC1/b3 and PBG1/b7 into pRTds vector

Accession (Gene name)	Amplicon Size	Primer for	Primer rev
at5g09900 (RPN5a)	1389 bp	AT/TTAGGTACCATGGAGACAGCGGAAAGCTTGAGGC	GCCCACTAGTATAACTCAACGAAGAAGATCCCTG
at1g09100 (RPT5b)	1272 bp	AT/TTAGGTACCATGGCAACGGCATTGGGGAGGATACG	GCCCACTAGTGGCTAGTAACTCAAGCTTGCTTCTTC
at1g21720 (PBC1/β3)	615 bp	GCGGGGGTACCATGTCGATCTCGAGTACAATGGAAGTGC	CGGGACTAGTATCCATCCCTCCCTTAGGATCCCTCC
at1g56450 (PBG1/β7)	741 bp	CGCGGGGGTACCATGACGACTTTCTGTTCCGATTG	ATTACTAGTCCAGGAGCCTGCAGCACCCAGCAGTGGG

Partie 1-2 : Le nucléole à 37°C chez *A. thaliana*

Chez les animaux, la structure et le contenu en protéines du nucléole sont affectés en cas de stress thermique (voir Introduction – Les autres rôles du Nucléole – Le nucléole sensateur de stress et remobilisateur de protéines). De manière intéressante, la protéine Rpt6 du protéasome et la protéine VHL, une E3 ubiquitine ligase, sont séquestrées dans les centres de détention des nucléoles de mammifères pendant un stress thermique à 37°C.

Par ailleurs, nous avons observé un impact de la chaleur sur la structure du nucléole chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* à 37°C (voir paragraphe : L'analyse structurale des nucléoles, dans la section : Le nucléole à 37°C chez *A. thaliana*). Il paraissait donc très intéressant de réaliser un protéome sur des nucléoles d'*A. thaliana* ayant été soumises à une température de 37°C.

Ces résultats sont préliminaires et nécessitent au moins un réplica de cette expérience. Mais la suite de ce projet permettra de faire un comparatif avec le système de rétention découvert chez les mammifères. Dans ce manuscrit, je présente les premières analyses réalisées sur le protéome que nous avons obtenu à 37°C

L'expérimentation

Des plantes *A. thaliana* Col-0, âgées de trois semaines, exprimant une fibrillarine fluorescente (avec le construct 35S::Fib2-YFP, Figure 30A) ont été soumises à une température de 28°C (stress « moyen ») ou 37°C (« stress fort ») pendant 24h (Figure 30B). Les nucléoles ont été observés en microscopie, extraits et traités comme dans l'article ci-avant (voir aussi dans Matériel et Méthodes – Méthodes de microscopie – Structure du nucléole par fluorescence ; Méthodes relatives aux protéines – Tri des nucléoles : FANoS).

A



B

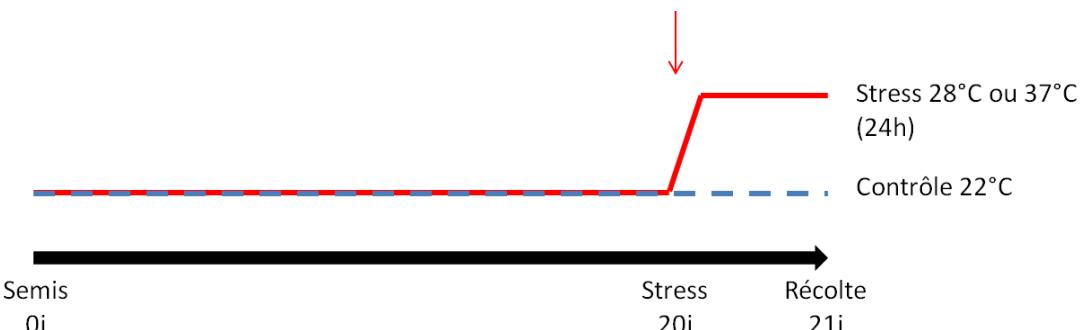


Figure 30 : Procédure expérimentale

A : Schéma de la protéine Fibrillarine (Fib2) couplée à la YFP, protéine fluorescente.

B : Schéma du plan de croissance des plantes d'*A. thaliana*, des semis (0j) à la récolte (21j). Les plantes contrôles ont poussé tout le long à 22°C, tandis que les autres ont été soumises à la chaleur (28°C ou 37°C pendant 24h).

L'analyse structurale des nucléoles

La chaleur induisant une déstructuration du nucléole chez les animaux (Jacob et al., 2013), nous avons tout d'abord réalisé des observations de nucléoles chez des plantes stressées ou non par la chaleur.

Pour cela, des plantes Col-0 ont été transformées, avec le construct 35S::Fib2-YFP, pour observer la Fibrillarine par fluorescence. Grâce à ce marquage, il est possible de distinguer les centres fibrillaires et le complexe fibrillaire de nuclosine du nucléole. C'est ce même marquage qui permet de trier par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), technique FANoS publiée par Pontvianne et al., en 2016.

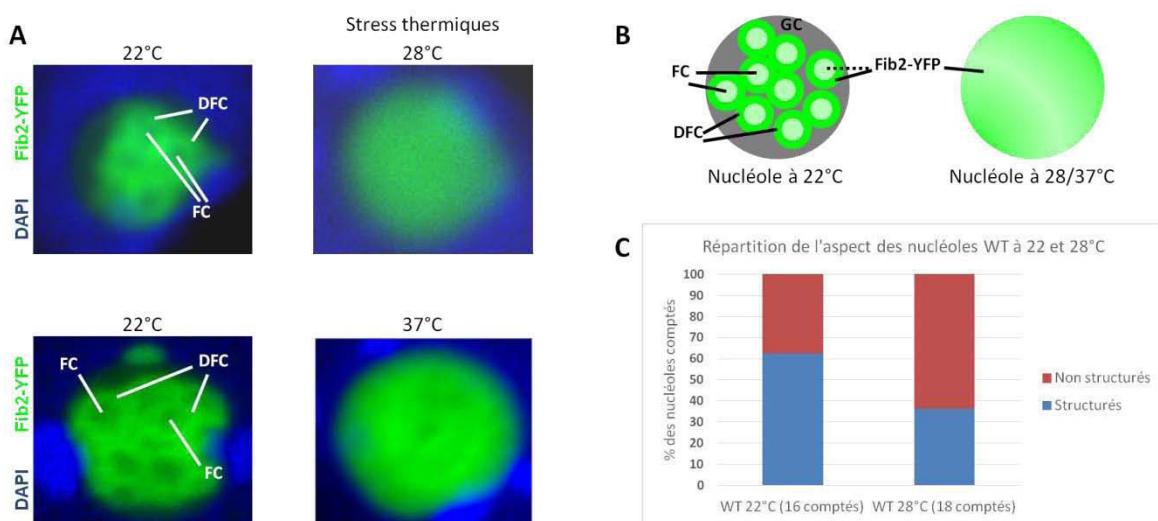


Figure 31 : Images et analyse de nucléoles d'Arabidopsis thaliana au microscope confocal à épifluorescence :

A : Images obtenues en microscopie. Les plantes ont été transformées avec le construct 35S::FIB2-YFP, pour exprimer la FIB2 couplée à la YFP, donc fluorescente, de manière constitutive. Elles ont poussé à 22°C jusqu'à 21 jours pour les conditions contrôles, les stressées jusqu'à 20 jours puis ont été placées en stress thermique pendant 24h à 28°C (expérience du haut, réalisée par moi-même) ou 37°C (expérience du bas, réalisée par M. Pontvianne au laboratoire). L'ADN contenu dans les noyaux a été marqué au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole). À 22°C, les structures internes du nucléole sont visibles (FC et DFC), alors qu'en conditions de stress (28 et 37°C), on ne voit qu'un halo flou. Cependant, tous les nucléoles en cas de stress ne sont pas totalement déstructurés, voir en B.

B : Schéma explicatif des photographies, les FC et DFC apparaissent en vert car contiennent la Fibrillarine couplée à la YFP.

C : Les nucléoles de l'expérimentation 22/28°C ont été répertoriés sous forme d'un graphique en pourcentages de nucléoles structurés (comme les photographies à 22°C, en bleu sur le graphique) et non-structurés (comme dans les photographies à 28 et 37°C, en orange).

Les nucléoles contiennent, 22°C, sont plus souvent présents sous une forme structurée (on distingue au moins les FC et DFC, Figure 31A-B). En effet, plus de 60% sont structurés (Figure 31C). En condition de stress thermique (28 et 37°C), les nucléoles sont plus souvent non-structurés, pour plus de 60% quand les plantes ont poussé à 28°C et en fait la Fibrillarine (Fib2) est répartie différemment. En conditions normales, elle est majoritairement localisée dans le DFC (d'où le nom de cette structure d'ailleurs), et elle est associée aux complexes snoRNP de type C/D, participant activement à la maturation des pré-ARNr (Barneche et al., 2001; Watkins and Bohnsack, 2012). La Fibrillarine dépose la méthylation sur la glutamine de l'histone H2A et s'associe au pré-ARNr naissant dans le complexe U3snoRNP (Saez-Vasquez et al., 2004; Tessarz et al., 2014).

Dans les nucléoles d'*A. thaliana* soumis à un stress thermique, il semblerait que la Fibrillarine soit répartie de façon homogène à l'intérieur du nucléole et ne se relocalise pas à la périphérie du nucléole, comme observé chez les animaux à 37°C (Jacob et al., 2013). Il est possible que la Fib2 s'associe moins aux complexes C/D snoRNP, ne « formant » plus le DFC, car peut-être la transcription et maturation des ADNr 45S sont moins actives.

De plus, pendant les tris de nucléoles par FACS, nous avons constaté que les nucléoles stressés ne présentaient pas tout à fait le même profil que les non stressés. En effet, comme on peut l'observer dans la Figure 32, les images diffèrent légèrement entre le 22°C (haut) et le 37°C (bas). Les nucléoles (points verts), qu'ils soient stressés ou non, peuvent avoir des tailles très différentes : de 0 à 250 sur l'échelle FSC (Forward Scatter), bien que la majorité soit entre 0 et 100. En revanche, si l'on regarde la complexité, ou granulosité (représentée par le paramètre SSC, Side Scatter) des nucléoles, on peut voir que la répartition de ceux stressés est plus large, de 0 à 200, que les contrôles (de 0 à 50, voire quelques uns à 100). De plus, on remarque que les nucléoles stressés sont plus fluorescents (jusqu'à plus de 10^5 en YFP) que ceux à 22°C (légèrement inférieurs à 10^5 pour les plus fluorescents).

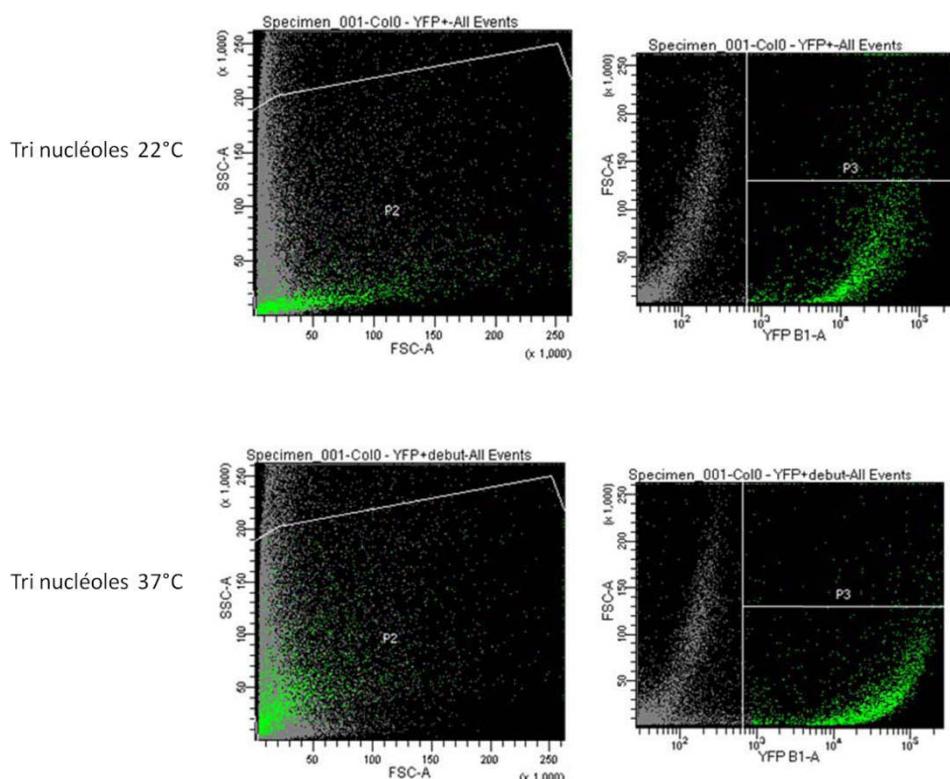


Figure 32 : Les nucléoles à 22 et 37°C n'ont pas la même texture

Ces images, obtenues lors du tri des nucléoles par FACS (par Mme Boyer-Clavel à Montpellier), représentent la façon dont sont triés les nucléoles par leurs propriétés physiques. Au début, les extraits cellulaires sont triés en fonction de leur taille et de leur complexité/granulosité, représentée par les paramètres FSC (Forward Scatter) et SSC (Side Scatter) respectivement. Une deuxième étape permet de dissocier les nucléoles des autres composants et/ou débris cellulaires, en séparant les éléments selon leur taille (FSC) et leur fluorescence (YFP). Les points gris correspondent aux « débris » cellulaires et les points verts aux nucléoles fluorescents (grâce à la Fib2-YFP).

Les nucléoles soumis à un stress semblent être plus « complexes » et plus fluorescents que les nucléoles contrôles à 22°C.

Il semblerait donc que les nucléoles de plantes exposées à la chaleur subissent des changements structurels. Ces nucléoles sont moins complexes, granuleux, signifiant que leur contenu change, ou sa structure différemment, et augmente par rapport aux non stressés. De plus, on constate un accroissement de la fluorescence dans les nucléoles soumis à la chaleur, ainsi qu'une relocalisation de la Fibrillarine de manière homogène dans les nucléoles. Cette répartition de la Fibrillarine explique peut-être l'accroissement de la fluorescence observé lors du tri par FACS, mais on ne peut exclure le fait qu'il y ait juste plus de Fibrillarine dans les nucléoles stressés.

Il serait alors intéressant de vérifier la teneur en Fibrillarine, par Western blot, des nucléoles stressés ou non, pour vérifier si l'augmentation de la fluorescence à 37°C est due à une accumulation de la protéine Fib ou à sa relocalisation dans le nucléole.

Chez les animaux à 37°C, les protéines présentes dans les centres de détention sont dotées de motifs appelés NoDS (Nucleolar Detention Signal) pour interagir avec de longs ARN non-codants qui les « amènent » au nucléole.

Au vu des modifications structurales et moléculaires du nucléole chez *A. thaliana* à 37°C, nous pouvons nous demander s'il existe des centres de détention dans les nucléoles de plantes stressées. Nous souhaitions en savoir plus sur la composition en protéines des nucléoles à 37°C, d'une part pour énumérer les protéines « séquestrées » dans le nucléole et comprendre les mécanismes de rétention, d'autre part pour voir si ces protéines ont une fonction nucléolaire en cas de stress.

Le protéome nucléolaire à 37°C

Les nucléoles triés par FACS ont été analysés à Strasbourg, dans l'équipe de Mme Carapito, par spectrométrie de masse pour déterminer le protéome nucléolaire.

Le nombre de nucléoles analysés à 22° et 37°C est équivalent. À 37°C, nous avons retrouvé 3189 protéines nucléolaires soit 5 fois plus de protéines que dans le protéome à 22°C. Les protéines ont été classées selon le COG (Cluster of Orthologous Group), comme dans l'article, et représentées en pourcentage pour faciliter leur analyse (Figure 33).

Certaines familles de protéines qui ne sont pas dans le nucléole en conditions standard (à 22°C), seraient relocalisées en conditions de stress. Il semble que ce soit le cas des protéines intervenant dans les mécanismes de défense (COG V), dans la structure nucléaire (COG Y), dans les structures extracellulaires (COG W), dans les mécanismes de transduction des signaux cellulaires (COG T), dans la mobilité intracellulaire (COG U), dans le transport et le métabolisme des lipides (COG I) ou dans la production de métabolites secondaires (COG Q).

De même, on peut voir que l'ordre de répartition des catégories change entre 22° et 37°C. À 22°C, les protéines impliquées dans la biogénèse des ribosomes (J) et dans la maturation et les modifications de l'ARN (A) sont majoritaires, suivies par les COG R (fonction prédictive) et O (renouvellement et modifications des protéines, chaperonnes). Alors qu'à 37°C, les catégories R et O deviennent majoritaires et sont suivies des COG J et A.

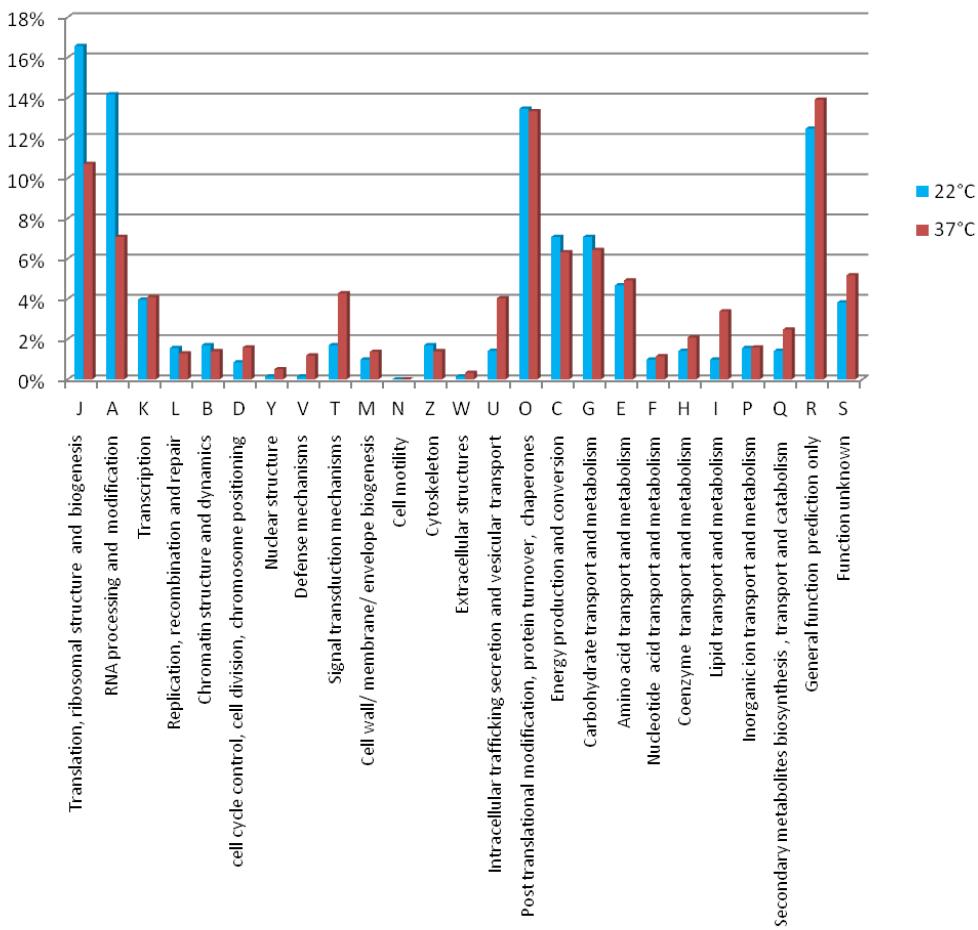


Figure 33 : Répartition des pourcentages des catégories COG dans les nucléoles à 37°C (rouge) et à 22°C (bleu)

Les pourcentages des protéines classées en catégories COG sont présentés dans ce graphique. En bleu (22°C), il s'agit de protéines retrouvées dans le protéome nucléolaire, publié dans l'article ci-dessus. En rouge (37°C), le protéome nucléolaire réalisé sur les plantes traitées à 37°C pendant 24h avant leur récolte.

À l'inverse, certaines catégories semblent pas être impactées par le stress thermique, comme par exemple les COG C, G, E, K et S. Les protéines de la catégorie S n'ont pas de fonction connue, celles de la catégorie C ont un rôle dans la production et la transformation de l'énergie. Dans la catégorie G, on trouve les protéines liées au transport du carbone et son métabolisme. Les protéines classées en K sont impliquées dans la transcription et celles en E dans le transport et le métabolisme des acides aminés.

Grâce à ces jeux de données, nous avons déjà une première idée des protéines et/ou catégories étant potentiellement régulées par séquestration nucléolaire.

Nous pouvons également affirmer que la structure et la composition en protéines des nucléoles sont impactées par un stress thermique chez *Arabidopsis thaliana*. Cela dit, il n'y a pas de réplica de cette expérience, les résultats du protéome nucléolaire à 37°C restent donc à confirmer.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude en se penchant sur les mécanismes de rétention des protéines au sein du nucléole, une fois la liste des protéines candidates réalisée.

Partie 2 : Le Fer dans le Nucléole

Comme déjà mentionné dans la Partie 1 et l'Introduction, le nucléole est impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Certains composés peuvent influencer directement les activités du nucléole en changeant son pH, ou en étant co-facteur pour des réactions enzymatiques par exemple.

Parmi ces composés, le fer est un micronutriment essentiel à la vie aussi bien chez les animaux que chez les plantes. En effet, chez les animaux un des rôles principaux du fer est le transport de l'oxygène dans le sang via les globules rouges (Nagy et al., 2010). Chez les plantes, le fer est essentiellement présent dans les chloroplastes et les mitochondries pour le transfert d'électrons dans la photosynthèse et la respiration cellulaire respectivement (Hantzis et al., 2018).

Lorsque l'homéostasie du fer se trouve perturbée, elle génère des maladies et/ou problèmes de croissance. Chez les plantes, un excès comme une carence induisent une perturbation de la croissance (sorte de nanisme) et à une chlorose des tissus aériens (Briat et al., 2015). Chez l'Homme, l'anémie est la maladie la plus fréquente liée à une déficience du fer (Heeney and Finberg, 2014), tandis qu'un excès en fer dans les cellules neuronales peut être corrélée à une neuroferritinopathie ou à la maladie d'Alzheimer par exemple (Kumar et al., 2016; Quintana et al., 2006). En fait, lorsque le fer est localisé dans le nucléole des cellules, il engendre des dommages sur l'ADN, ou seulement aux ARN ribosomiques et aux ribosomes, impactant ainsi la capacité de traduction des cellules (Henle et al., 1996, 1999; Honda et al., 2005).

Cependant chez les plantes, Roschzttardtz et al. (2011) ont démontré que le nucléole est chargé en fer en conditions normales, tout comme les chloroplastes et mitochondries.

Il paraît intéressant alors de s'interroger sur le potentiel rôle du fer dans le nucléole de ses plantes et de son implication possible dans la biogénèse des ribosomes.

Nous avons choisi d'étudier cette question en analysant des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) sauvages (WT), contenant du fer nucléolaire, et des plantes mutantes pour trois gènes codant pour la Nicotianamine Synthase (NAS), ne contenant pas de fer dans leurs nucléoles. Les résultats obtenus sont présentés ici sous la forme d'un article en préparation.

Le Fer dans les plantes

Du sol aux racines

Les plantes captent le fer du sol *via* leurs racines. Deux grandes stratégies d'acquisition du fer ont été développées par les plantes (Mori, 1999).

Les graminées (ou *Poaceae*, Monocotylédone), utilisent la Stratégie II (Figure 34, à droite), dans laquelle la protéine Transporter O f M u gineic aci d 1 (TOM1) libère des phytosidérophores tels que l'acide déoxymuginéique (DMA), des agents chélateurs des ions Fe^{3+} notamment, dans la rhizosphère pour chélater le fer. Ces complexes sont ensuite intégrés dans la racine par les protéines Yellow Stripes (YS), mais également par IRT1 (voir ci-dessous).

Les autres plantes utilisent la Stratégie I (Figure 34, à gauche), dans laquelle le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) dans la rhizosphère par l'action de FRO2 (Ferric Reductase Oxydase 2) et d'ATPase qui acidifient le sol en larguant des protons H^+ . Le fer ferreux est ensuite absorbé dans les racines par la protéine IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1). Par ailleurs, IRT1 est également présent chez d'autres plantes, comme le riz, et peut absorber le Fe^{2+} s'il se trouve disponible dans le milieu environnant (Connerton et al., 2017; Darbani et al., 2013; Dubeaux et al., 2018; Hindt and Guerinot, 2012; Murata et al., 2015).

Le fer, s'il ne passe pas par la voie symplastique (dans les cellules) peut passer par la voie apoplastique (entre/dans les parois cellulaires) à partir des racines et rejoindre l'endoderme, dans lequel les bandes de Caspary l'obligent à entrer dans les cellules (Connerton et al., 2017).

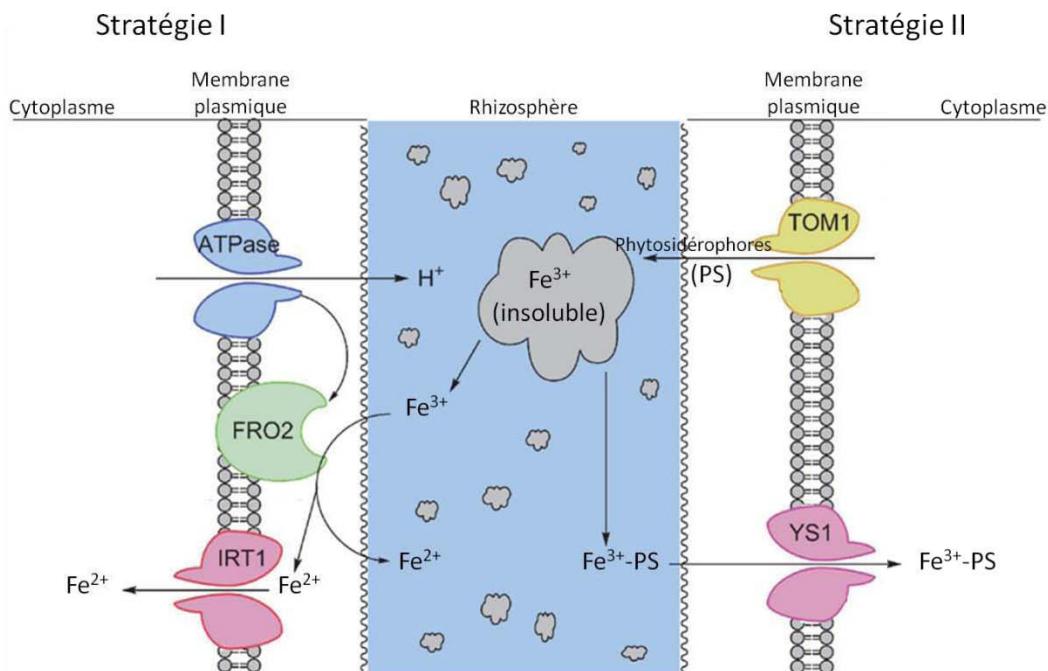


Figure 34 : Deux stratégies distinctes d'absorption du fer chez les plantes (d'après Murata et al., 2015)

La stratégie II, spécifique aux graminées, utilise des phytosiderophores (PS), relâchées par TOM1, pour chélater le Fe^{3+} dans le milieu et importer ce complexe dans les racines. La stratégie I, pour toutes les autres plantes, réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} par acidification du sol et action de FRO2, le fer ferreux peut ainsi être absorbé par les racines, grâce à IRT1.

Dans la plante

Au sein de la plante, le fer est toujours chélaté, et n'est quasiment jamais sous une forme libre, empêchant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors des réactions de Fenton.

Dans les cellules végétales (Figure 35), le fer est amené par YSL2 (Yellow Stripe Like 2) aux vaisseaux du xylème et est ensuite redistribué dans la plante. Dans le xylème (sève brute), voie apoplastique puisque les cellules sont mortes, il est chélaté au Citrate sous la forme Fe^{3+} . Une fois arrivé aux parties aériennes, il retourne dans la voie symplastique principalement grâce aux protéines FRO6 et IRT3 qui vont le réduire en Fe^{2+} (Connerton et al., 2017; Grillet et al., 2014).

Le fer peut aussi être amené au phloème (sève élaborée) pour être distribué dans les parties aériennes, c'est le travail de OPT3 (OligoPeptide Transporter 3), YSL1 et 3. Les protéines YSL interviennent lors de l'acheminement du fer dans les graines, puisque celles-ci en consomment beaucoup lors de la germination, jusqu'à ce que la première racine soit en contact avec le sol (Connerton et al., 2017 ; Grillet et al., 2014; Kumar et al., 2017; Roschzttardtz et al., 2013; Zhai et al., 2014).

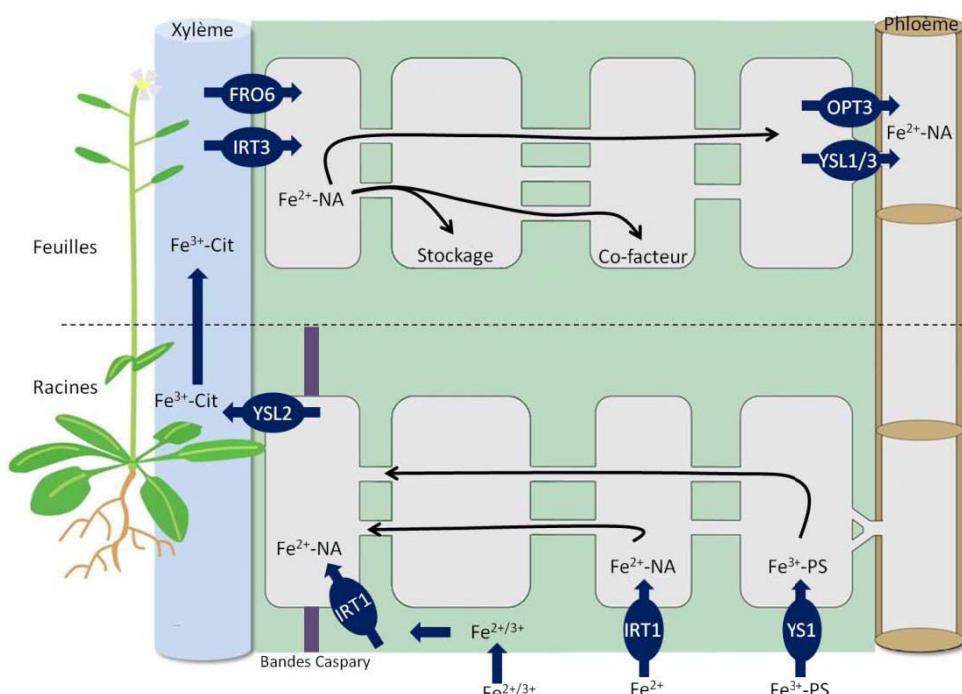


Figure 35 : Distribution du fer dans la plante

Le fer est capté par les racines dans le sol, il est absorbé par les cellules, au plus tard dans l'endoderme où il se heurte aux bandes de Caspary, sous forme Fe^{2+} ou Fe^{3+} . Il est ensuite transporté dans le xylème sous la forme Fe^{3+} -Cit puis est réintégré dans les cellules en Fe^{2+} -NA avant d'être stocké ou utilisé comme co-facteur. Il peut également être amené au phloème pour redistribution dans d'autres organes, notamment les graines.

Dans la cellule, et entre les cellules *via* les plasmodesmes, le fer sous la forme Fe^{2+} est chélaté à la Nicotianamine (NA), un chélateur des ions bivalents comme le Zn^{2+} , mais également un précurseur de l'acide muginéique. La NA est un acide aminé non-protéique synthétisé par la Nicotianamine Synthase (NAS) à partir de *S*-adénosyl-méthionine (SAM). Chez *A. thaliana*, quatre gènes codent pour la NA et sont exprimés de manière différente dans les tissus. NAS1 et NAS4 sont exprimées dans les feuilles et racines, NAS2 dans les racines uniquement et NAS3 est spécifique des parties aériennes, feuilles et organes floraux (Connerton et al., 2017; Grillet et al., 2014; Klatte et al., 2009).

Le fer acteur dans la cellule

Dans la cellule, le fer est stocké majoritairement dans la vacuole ou complexé à des Ferritines (Figure 36).

Le fer est amené dans la vacuole par le transporteur VIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1). Les Ferritines (FER) s'assemblent en un homopolymère de 24 protéines qui forment une sorte de coquille autour des ions fer. Les complexes Ferritines peuvent contenir jusqu'à 4500 ions fer et sont majoritairement présents dans les plastides (Briat et al., 2010; Connerton et al., 2017; Darbani et al., 2013; Reyt et al., 2015; Roschzttardtz et al., 2013).

Plus particulièrement, les ions fer sont retrouvés dans les chloroplastes et mitochondries pour être facilement disponibles aux enzymes nécessitant du fer comme co-facteur (Figure 32).

Dans le chloroplaste, le fer agit comme donneur d'électron pendant la photosynthèse. Plus particulièrement, il est présent dans le photosystème I et les ferrédoxines, sous la forme Fe-S (cluster fer-soufre de certaines protéines), c'est-à-dire du Fer (Fe^{2+}) associé au soufre (S^{2-}). Les clusters Fe-S sont liés à au moins une cystéine de la protéine dont ils sont co-facteurs.

D'autres protéines contenant ces clusters Fe-S sont également impliquées dans le transfert d'électrons lors de la respiration réalisée par les mitochondries, dans les complexes I et II. Le fer peut également être sous forme d'hème ou hémine, un ion Fe^{2+} ou Fe^{3+} associé à quatre molécules de protoporphyrine IX en cercle, comme dans les complexes I II et IV de la respiration mitochondriale. L'hème est alors un composant de protéines telles que les peroxydases et le cytochrome P450, dans le peroxysome et le réticulum endoplasmique (Balk and Schaedler, 2014; Connerton et al., 2017).

Le fer peut également être co-facteur d'enzymes sous la forme de centres mono ou di-fer (formation $\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}$), liés à la protéine par une histidine, un glutamate et un aspartate. Les enzymes contenant ces centres mono ou di-fer sont impliquées dans l'hydroxylation et l'oxygénéation, et sont présentes dans tous les compartiments cellulaires (Balk and Schaedler, 2014; Connerton et al., 2017; Darbani et al., 2013).

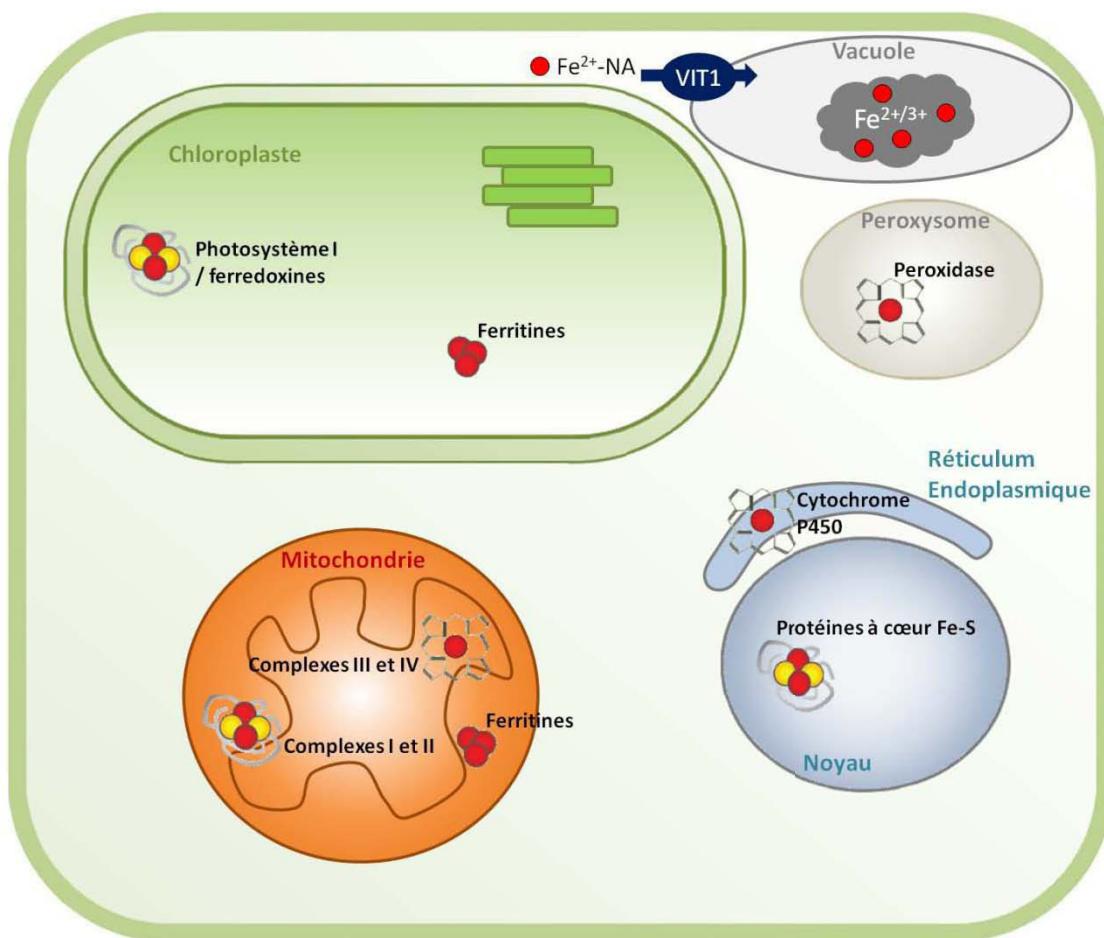


Figure 36 : Le fer dans la vie cellulaire (d'après Connerton et al., 2017)

Dans la cellule, le fer peut être stocké dans la vacuole ou dans des complexes Ferritines pour être disponible rapidement. Il peut ensuite être co-facteur d'enzymes, majoritairement sous la forme de cœur fer-soufre (Fe-S) comme dans les complexes I et II de la mitochondrie ou le photosystème I et les ferredoxines du chloroplaste. Il peut aussi agir sous la forme d'hème dans le cytochrome P450 (réticulum endoplasmique), les peroxidases, ou les complexes III et IV de la mitochondrie par exemple. Des protéines à cœur Fe-S sont également présentes dans le noyau.

Lorsque le fer est libre dans la cellule, dans le cas d'un excès ou dans des mutants de la Ferritine, il va induire la production de ROS (Espèces Réactives de l'Oxygène) telles que l' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène). La détoxicification de ces ROS fait intervenir des enzymes comme la Catalase (CAT), l'Ascorbate peroxydase (APX), des glutarédoxines (GRX) et thioredoxines (TRX), ainsi que des protéines à cœur mono ou di-fer ayant une activité oxygénase (Chen et al., 2012; Reyt et al., 2015; White and Flashman, 2016; Yu et al., 2017; Yuan et al., 2017).

Protéines à cœur fer-soufre et biogénèse des ribosomes

Des études sur la levure ont montré l'existence d'un lien entre la biogénèse des ribosomes et la production de protéines à cœur fer-soufre.

En effet, la mutation des protéines Rix19/Cfd1, Nbp35 et NAR1, impliquées dans la biosynthèse du cluster Fe-S, entraîne une diminution de la biogénèse des ribosomes et affecte l'exportation des sous-unités. Cependant, ce lien serait indirect, puisque la mutation de ces protéines aurait un impact sur la formation du cluster Fe-S de Rli1, qui est une protéine impliquée dans la biogénèse des ribosomes (voir Introduction - Le Nucléole et les ribosomes - Biogénèse/Assemblage - Les pré-sous-unités 40S et 60S).

Par ailleurs, les sous-unités NRPA3 et NRP C3, sous-unités de ARNPol I et ARNPol III respectivement chez *A. thaliana*, sont elles aussi pourvues d'un cluster Fe-S. Ces protéines sont les homologues de A C40 chez la levure, Rpb3 (sous-unité D) chez les *Archaea* (Fernández-Tornero et al., 2013; Hirata et al., 2008; Ream et al., 2015).

Article en préparation :

“*NAS1,2,4* genes disruption induces loss of nucleolar iron and rDNA expression from normally silenced NOR in *A. thaliana*”

1 ***NAS1,2,4* gene disruption induces loss of nucleolar iron and rDNA
2 expression from normally silenced NOR in *A. thaliana***

3

4 Montacié C.^{1,2}, Jobet E.^{1,2}, Pontvianne F.^{1,2}, Wei L.³, Escande M.L.^{4,5}, DeBures A.^{1,2}, Laudié
5 M.^{1,2}, Llauro-Berger C.^{1,2}, Barbarossa A.^{1,2}, Riondet C.^{1,2}, Mari S.³ and Sáez-Vásquez J.^{1,2}

6

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

9 ²Univ. Perpignan Via Domitia, LGDP, UMR 5096, 66860 Perpignan, France.

10 ³Campus INRA/SupAgro, CNRS, Université de Montpellier, Biochemistry & Plant Molecular
11 Physiology, UMR5004, 34060 Montpellier, France.

12 ⁴CNRS, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, 66650 Banyuls-sur-mer, France

13 ⁵BioPIC Platform of the OOB, 66650 Banyuls-sur-mer, France

14

15

16 **ABSTRACT**

17 The biogenesis and structure of the nucleolus are directly linked to ribosome synthesis.
18 Remarkably, in contrast to yeast and animal cells, plant nucleoli contain a major pool of iron
19 (Roschzttardtz *et al.*, 2011). Here, we studied functional rDNA organization in *Arabidopsis*
20 plants with reduced amount of iron in the nucleolus: *nas* (nicotianamine synthase) mutant
21 plants. We observed that in *nas1,2,4* plants 45S rRNA Var1 genes are expressed, indicating
22 the activation of the normally silenced NOR2. In contrast, reduced amount of iron does not
23 affect rRNA processing and/or ribosome assembly. Furthermore we observed more FC in the
24 *nas1,2,4* mutant compared to WT plants indicating increased number of transcriptionally
25 active rRNA genes. De-repression of NOR2 is also correlated with its association to nucleolus
26 and with rDNA methylation changes. Surprisingly, 5'ETS is hypermethylated rather than
27 hypomethylated in the *nas* plants. Altogether the results suggest that NOR2 expression in *nas*
28 mutant corresponds to a failed-silencing of NOR2 during early stage of plant development.

29 **INTRODUCTION**

30 The nucleolus is a multifunctional structure linked to ribosome biogenesis and stress response
31 (Boulon et al. 2010; Hernandez-Verdun et al. 2010; Stepinski 2014; Tsai and Pederson 2014;
32 Pederson and Powell 2015; Tsekrekou et al. 2017). Ribosome biogenesis is initiated following
33 transcription of 45S rRNA genes (45S rDNA) by RNA polymerase I (pol I). The 45S rDNA
34 encode for the 18S, 5.8S and 25S structural rRNA that assemble with 5S rRNA and ribosomal
35 proteins (RP) to form ribosome particles (Fatica and Tollervey 2002; Fromont-Racine et al.
36 2003; Ebersberger et al. 2014; Weis et al. 2015; Sloan et al. 2017).

37

38 In *Arabidopsis thaliana*, 45S rDNA localize in Nucleolar Organizer Regions (NORs) from
39 chromosomes 2 and 4 (NOR2 and NOR4) (Copenhaver and Pikaard 1996b; Copenhaver and
40 Pikaard 1996a). The NOR2 contain specific 45S rDNA variant 1 (VAR1) while the NOR4
41 contain specific 45S rDNA variant 2 and 3 (VAR2 and 3) (Chandrasekhara et al. 2016). After
42 4-5 days of germination and in all plant organs only rDNA from NOR4 (VAR 2 and 3) is
43 transcribed. Noteworthy, rDNA from NOR2 (VAR1) is expressed during seed germination
44 and in plant mutant for specific ribosome biogenesis factors (Earley et al. 2010; Mozgova et
45 al. 2010; Pontvianne et al. 2010; Pontvianne et al. 2012; Pontvianne et al. 2013; Durut et al.
46 2014; Merai et al. 2014; Sanchez-Garcia et al. 2015; Duc et al. 2017) .

47

48 In plant cells, along with the chloroplasts and mitochondrion, a large pool of iron is contained
49 in the nuclei and more specifically in the nucleolus mainly (Roschzttardtz et al. 2011). Iron is
50 one of the most important micronutrients in plants growth, implicated in almost every cell
51 process. Iron excess or deprivation lead to severe growth phenotypes in plants: decrease in
52 biomass production and chlorosis on leaves (Briat et al. 2015). Indeed, iron plays a major role
53 in electron transfer in chloroplast and mitochondria (for respectively photosynthesis and
54 respiration), as co-factor for enzymatic reactions and in plant redox state (Hantzis et al. 2018).

55

56 Accumulation of iron in the plant nucleolus is quite interesting regarding the impact of
57 nucleolar iron in human cells (Honda et al. 2005; Quintana et al. 2006). Several diseases are
58 related to iron amount in human cells, including neuroferritinopathy or Iron-Refractory Iron
59 Deficiency Anemia (Heeney and Finberg 2014; Kumar et al. 2016) and Alzheimer's disease
60 (AD) (Quintana et al. 2006). In Alzheimer's disease, iron damages DNA (Henle et al. 1996;
61 Henle et al. 1999) and bounds directly to ribosomal RNA (rRNA) leading to their oxidization,
62 as well as ribosomes, impacting on translation efficiency (Honda et al. 2005).

63

64 So far not much it is known how iron affect ribosome biogenesis in plants. Nevertheless it was
65 reported that excess or deficiency of iron induced differential expression of ribosomal protein
66 genes in *Arabidopsis*, suggesting ribosome heterogeneity in response to iron conditions
67 (Rodriguez-Celma et al. 2013; Wang et al. 2013). Hence, we wanted to investigate the role of
68 iron in controlling expression of specific 45S rRNA genes and assembly of ribosome in
69 *nas1,2,4* plants that lack nucleolar iron. The data suggest that absence of iron in the nucleolus
70 affects nucleolus structural re-organization and expression of NOR2 which normally
71 is repressed by epigenetic mechanism.

72

73 RESULTS

74 Expression of rDNA variants in *nas*, *fer* and *ysl* mutant plants

75 To determine the impact of iron in nucleolus activity, we looked for plant mutants with
76 disrupted expression of genes involved in iron metabolism. We examined rDNA expression
77 in plant mutants for Yellow Stripe Like (YSL), Nicotinamine Synthase (NAS) and ferritin
78 (FER) protein genes. In plants, YSL and FER respectively required for iron transport and
79 storage, while NAS is required for Nicotianamine (NA) synthesis that in turn chelates iron
80 (Klatte et al. 2009; Grillet et al. 2014; Reyt et al. 2015).

81

82 To verify expression of rDNA variants from NOR2 (VAR1) and/or from NOR4 (VAR2 and
83 3) in *fer*, *nas1,2,4* and *ysl* plants we performed RT-PCR analysis with primers that amplified
84 3'ETS rDNA VAR1-4 (Fig. 1, left panel). RT-PCR amplification of the 3' ETS generates
85 specific product sizes for each rRNA variant (Pontvianne et al. 2010). This analysis shows
86 clearly specific expression of rRNA VAR1 in *nas1,2,4* but not in *fer* and *ysl* plants. It is noted
87 also that in *nas1,2,4* rRNA VAR2 was expressed as in WT while rRNA VAR3 was repressed.
88 Expression of rRNA VAR1 in *nuc1* and *nuc2* plants was previously reported (Pontvianne et
89 al. 2010; Durut et al. 2014) and it is tested here to visualize rDNA VAR1 expression.

90

91 The genome of *A. thaliana* contains 4 NAS proteins genes (*NASI-4*). These are constitutively
92 expressed in different plant tissues and organs (Klatte et al. 2009). To determine more
93 precisely which *NAS* gene is required for rRNA VAR1 expression, we analyzed the reported
94 triple mutants *nas1,2,4*; *nas1,2,3*; *nas2,3,4* and *nas1,3,4*. The RT-PCR analysis shows that all
95 triple mutants containing *NASI* disruption (*nas1,2,4*; *nas1,2,3* and *nas1,3,4*) express rRNA

96 VAR1. The strongest rDNA VAR1 expression was observed in *nas1,2,4* plants (Right panel
97 and Fig.S1).

98

99 **Perls/DAB staining show Loss of nucleolar iron in *nas1,2,4* plants**

100 As reported previously, the *nas1,2,4* do not shown any growth and/or plant developmental
101 defect compared to the WT plants either grown on soil or *in vitro* conditions (Fig.1A). In
102 contrast it contain lower amount of NA compared to WT (Fig.1B and (Klatte et al. 2009)).
103 Then, we performed Perls/DAB staining on 15 days -old plant leaves to determine if *nas1,2,4*
104 could have lower a mount of nucleolar iron, be cause of a miss distribution of iron
105 between/inside parenchymal cells. The Perls/DAB staining detected iron in WT mesophyll
106 cells, as previously reported (Roschzttardtz et al. 2011), however, it did not detected iron in
107 *nas1,2,4* nucleolus (Fig.1C). We also observed that iron form aggregates specifically in
108 *nas1,2,4*, that might correspond to iron -ferritin complexes

109

110 **TEM analysis reveals increased number of Fibrillar Centers in *nas1,2,4* plants**

111 Nucleolus structure organization is deeply linked to rDNA transcription activity. Then we
112 examined if rDNA VAR1 expression affects functional structures of the nucleolus in *nas1,2,4*
113 plants. Furthermore, we could also expect that much lower (undetectable) amount of nucleolar
114 iron in *nas1,2,4* could also affect nucleolar structural organization. We performed
115 Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis (Fig. 3A). This technique allow to
116 visualize the three major functional structures of the nucleolus: Fibrillar centers (FC) where
117 localize transcriptional active 45S rDNA, Dense Fibrillar Components (DFC) place of
118 primary events of rRNA processing and the Granular Component (GC), mainly composed of
119 pre-ribosomes particles. Transcription of rDNA by RNA Pol I occurs at the interphase of FC
120 and DFC (Saez-Vasquez and Medina 2008; Hernandez-Verdun et al. 2010).

121

122 The TEM analysis of roots tips from 15 days-old plants revealed that *nas1,2,4* and WT
123 nucleoli have similar size (Fig. 3B, left). However, this analysis revealed also that *nas1,2,4*
124 nucleoli contain more FC structures compared to WT nucleoli (Fig. 3B, right). Since
125 nucleolus size, activity and organization is highly dynamic and dependent on the plant grow
126 (Saez-Vasquez and Medina 2008), we also performed this analysis on roots from 5 and 10
127 day-old plants. In 5 days-old plants, nucleoli from both genotypes are larger and contain more
128 FC than nucleoli from 15 days-old plants. However, in contrast to 15 old plants, the number
129 of FC in *nas1,2,4* and WT remain similar. In other hand, nucleoli from 10 days-old WT and

130 *nas1,2,4* plants display also similar size, however, similar to 15-days-old plants, more FC
131 were counted in nucleoli from *nas1,2,4*. Nucleoli from 5 days-old WT and *nas1,2,4* plants
132 contain approximately between 5 and 50 FC. The majority of 10 and 15 days-old WT nucleoli
133 contained less than 15 FC whereas the three-quarters of 10 and 15 days-old *nas1,2,4* nucleoli
134 hold between 12 and 30 FC. Altogether, the TEM analysis suggest that *nas1,2,4* contain a
135 larger number of transcriptional active rDNA.

136

137 *Arabidopsis thaliana* Col0 has around 1500 rDNA copy genes per genome diploid (Layat et
138 al. 2012; Mohannath et al. 2016). rDNA VAR1 genes represent around 50% of total rRNA
139 gene units, while VAR2 and 3 represent roughly 25% each. Interestingly, expression of rDNA
140 VAR1 from NOR2 has been reported in mutant plants with lower copy number (Mozgova et
141 al. 2010; Pontvianne et al. 2012) or altered proportion (Durut et al. 2014) of rDNA variants.
142 To verify gene copy number and/or stability of 45S rDNA chromatin we performed qPCR of
143 *nas1,2,4* and siblings over four generations. This analysis shows that *nas1,2,4*, from 1st to
144 4th generations, have similar 45S rDNA copy number than WT plants. Furthermore, PCR
145 analysis shows no differences in the ratio of rDNA VAR in *nas1,2,4* (Fig. S1).

146

147 **Nucleolus association of NOR2 in *nas1,2,4* plants**

148 Only active NORs associate to the nucleolus while inactive ones do not (Fransz et al. 1998;
149 Fransz et al. 2002). To confirm transcriptional activation of NOR2, we performed
150 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) experiments using a 45S rDNA probe to detect
151 NOR2 and NOR4 and their relative localization to the nucleolus (Fig.4). In this experiment,
152 the 45S rDNA probe was red labeled while the nuclear DNA was detected with DAPI (blue
153 staining), highlighting the nucleoplasm. The black hole in the nucleus corresponds to the
154 nucleolus that it is not stained because the rDNA chromatin is decondensed and too thin to be
155 stained by DAPI. In WT nuclei, FISH probe detects a single and strong signal (active NOR4)
156 associated to the nucleolus while two weak signals non-associated (inactive NOR2s), localize
157 close to the nucleus border. In contrast, in *nas1,2,4* nuclei, FISH detects 3 signals associate to
158 the nucleolus and a single one is not associated, indicating that at least one NOR2 associate to
159 the nucleolus (Fig. 4A, left). This analysis was done on 32 WT and 18 *nas1,2,4* nuclei and
160 globally there are ~2-fold more associated signals (red bars) and ~3-fold less of non-
161 associated signals (red bars) in *nas1,2,4* nuclei compared to WT (Fig.4A, right). Taken
162 together, these results indicate that NOR2 is activated (or either not-repressed) in *nas1,2,4*
163 plants.

164

165 **45S promotor is CHH and CHG hypermethylated in *nas1,2,4***

166 Regarding expression of rDNA VAR1 from NOR2, we analyzed 45S rDNA epigenetic state
167 in *nas1,2,4* plants (Fig. 5). Transcriptionally active rDNA is hypomethylated and associated to
168 acetylated (H3Ac and H4Ac) or methylated histones H3K4^{me2} while inactive rDNA is
169 hypermethylated and associated to methylated histone H3K9^{me2} (Probst et al. 2004; Espada et
170 al. 2007; Earley et al. 2010).

171

172 First, we performed bisulfite analysis of promoter and 5'ETS rDNA sequences from -315 to
173 +243 (Fig. 5A). Noteworthy, CG sites are more present downstream of TIS whereas there is
174 an enrichment in CHG and CHH sites upstream of TIS. Only a slight hypomethylation can be
175 detected at specific sites in the 5'ETS. The bisulfite analysis revealed that CG (red bars)
176 methylation rate in *nas1,2,4* is similar to WT. In contrast, there is higher CHG (blue bars) and
177 CHH (green bars) methylation rate in *nas1,2,4* plants upstream of the TIS, than in the WT
178 (Fig. 5B).

179

180 Next to determine if the CHG and CHH hypermethylation is rDNA variant specific (either
181 VAR1 and/or VAR2 and/or VAR3) we performed bisulfite analysis of the 3'ETS rDNA
182 region (Fig. S2A). In contrast to the promoter and 5'ETS regions, the CG, CHG and CHH
183 sites are randomly distributed in the 3'ETS region of all rDNA variants. The bisulfite analysis
184 did not reveal significant differences in the methylation state between rDNA variants from
185 *nas1,2,4* and WT plants. In *nas1,2,4* VAR1, only one CG site at position 44 was significantly
186 hypomethylated (Fig. S2A), but this difference was not statistically significant.

187

188 We also examined histone marks by Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) followed by
189 qPCR analysis. Primers matching coding and non-coding rDNA sequences did not detect
190 changes of neither active (H3Ac and H3K4m2) or inactive (H3K9m2) histone marks in
191 *nas1,2,4* compared to WT plants (Figure S2B).

192

193 **Transcription initiation from TIS preferred in *nas1,2,4***

194 Transcription and primary cleavage of 45S rRNA precursors are coordinated in plants and
195 animal cells (Dragon et al. 2002; Saez-Vasquez et al. 2004). To address this point in *nas1,2,4*,
196 plants we measure transcription from TIS and cleavage at the P site of 45S pri-RNA. In
197 *Arabidopsis thaliana* TIS localize in the initiator element TATAAGGGG (+1 underlined)

198 (Doelling and Pikaard 1995) while the P site localizes at +1273 (Saez-Vasquez et al. 2004).
199 We performed primer extension experiments using the *tis* and p primers that map accurately
200 transcription initiation and processing at the P site (Fig. 6A and (Pontvianne et al. 2007)).

201
202 As expected, primer extension analysis mapped transcription start site at position +1 in WT.
203 Although a one nt shorter signal of similar intensity was also detected (Fig. 6B, panel TIS).
204 Similar signals are also detected in *nas2,3,4* used as a control. In contrast to WT and
205 *nas2,3,4* a single signal at +1 was detected in *nas1,2,4*. A single signal at +1 is also detected
206 in *nuc1*, that expresses also VAR1 and then used as a control. In contrast, primer extension
207 with p primer detected a single signal of similar size and intensity in all samples analyzed
208 (panel P). No obvious difference P/TIS signal was observed in *nas1,2,4* compared with WT.

209
210 To find out the basis of two or one TIS signals, we examined 105 rDNA sequences (from -5
211 to +104) derived from bisulfite experiments (Fig.5 and (Durut et al. 2014)). This sequence
212 contain the initiator element (Doelling and Pikaard 1995) and sequence expected to be reverse
213 transcribed from primer *tis*. This analysis revealed two major single nucleotide deletions: one
214 at +40 and another at + 53 (Fig. 6 and S3). Thus, primer extension using *tis* primer might
215 generates from rDNA del +40 and del+ 53 respectively, 104 nt and 103 nt long transcripts.
216 Deletion at +40 or + 53 is found in ~25% of the rDNA sequences. The remaining rDNA
217 sequences (~75%) do not show in/del at these (or others) positions, although several
218 nucleotides polymorphisms can be detected as well. These numbers are in agreement with
219 estimated ~50% VAR1, ~25% VAR2 and ~25% VAR3 (Pontvianne et al. 2010).

220

221 DISCUSSION

222 The focus of this work was to study how nucleolar iron affects nucleolus structure and
223 ribosome biogenesis in plants. For this we looked for plant mutants for protein genes involved
224 in iron transport, chelating and/or storage that might affect functional rDNA chromatin
225 organization. We found that the triple mutant *nas1,2,4* express specifically rDNA VAR1 from
226 NOR2. Remarkably; only *nas* triple mutant with a disrupted *NAS1* gene expressed rDNA
227 VAR1, suggesting that *NAS1* is specifically required for NOR2 de-repression (Fig.1). In
228 agreement, the *nas2,3,4* plant mutants exhibited WT molecular phenotypes in all performed
229 experiments (Fig. S6-10). Interestingly, the four triple mutant plants contain similar amount of
230 NA, but much lower compared to WT plants (Klatte et al. 2009), indicating that *NAS1* (but
231 not NA level) is required for rRNA VAR1 expression. However, in a *nas1* simple mutant

232 rDNA VAR1 is not expressed indicating that *NAS1* disruption alone is not sufficient to induce
233 or de-repress expression of rDNA VAR1 from NOR2 (data not shown).

234

235 The *nas1,2,4* plants do not show any specific plant phenotype (Fig. 2 and (Klatte et al. 2009)
236 Noteworthy *nas1,2,4* plants germinated and grown in absence or in excess of iron did not
237 show neither growth nor development defect compared to WT plants (Fig. S4). In contrast,
238 quadruple *nas1,2,3,4* mutants are sterile and show a chloronerva-like phenotype (*nas4x-2*) or
239 developed chlorotic leaves, which became severe upon transition from the vegetative to the
240 reproductive phase (*nas4x-1*) (Klatte et al. 2009).

241

242 The *nas1,2,4* plants contain low (or undetectable) amount of nucleolar iron and show
243 formation of iron aggregates, probably ferritin complexes (Fig. 2). We do not know yet if
244 these plants contain overall reduced amount of iron that might affect for instance redox
245 balance as shown in human cells (Honda et al. 2005; Quintana et al. 2006). However, this
246 seems not to be the case since two of the three most important ROS detoxification enzymes,
247 Catalase and Ascorbate Peroxidase, display the same activity efficiency in WT and *nas1,2,4*
248 plants. Besides, peroxide oxygen (H_2O_2) detection, thanks to DAB staining, allowed us to see
249 that H_2O_2 present the same distribution between WT and *nas1,2,4* seedling (Fig. S5).

250

251 Remarkably, loss of nucleolar iron in *nas1,2,4* is antagonistic to observations in human cells.
252 Indeed, in human nucleoli containing increased amount of iron, the rDNA promoter is
253 hypermethylated to silence or inhibits transcription (Pietrzak et al., 2011; Quintana et al.,
254 2006).

255 Higher number of FC in the nucleolus of *nas1,2,4* plants suggest increased transcriptional
256 active rDNA genes in these plants (Fig. 3). In agreement, our results demonstrate clearly
257 expression of rDNA VAR1 and de-repression of NOR2 (Fig. 1 and 4). In this context, an
258 increased number of FC in *nas1,2,4* could be correlated with more transcriptionally active
259 NOR2-rDNA VAR1 copies associated to the nucleolus.

260

261 VAR1 expression has been also reported in *nuc1*, *nuc2*, *fas2*, *hda6*, *atrx5*, *atrx6* and *suvh4/5/6*
262 mutants (Earley et al. 2010; Mozgova et al. 2010; Pontvianne et al. 2010; Pontvianne et al.
263 2012; Pontvianne et al. 2013; Durut et al. 2014). In most of these mutant plants rDNA VAR1
264 expression is associated with rDNA CpG hypomethylation, changes in the rDNA copy
265 number or ratio and/or rDNA chromatin decondensation. Interestingly, none of these

266 molecular phenotypes were detected in *nas1,2,4* (Figs. S 1 and 2). In contrast we detected
267 increased CHG and C HH methylation specifically on the rDNA promoter (Fig. 5). This is
268 unexpected, because increased DNA methylation is generally correlated with gene repression
269 (Probst et al. 2004; Earley et al. 2006; Espada et al. 2007). Then, it is possible that detected
270 CHG and C HH hy permethylation might be specifically linked to rDNA VAR3,
271 transcriptionally repressed in *nas1,2,4* rather than VAR1 expression (Fig. 1). In 3'ETS variant
272 regions, there is not significant difference in the methylation pattern in *nas1,2,4* plants that
273 might explain NOR2 activation, as observed in *nuc2* plants (Durut et al., 2014). Neither we
274 observed changes in the level of H3Ac, H3K4 and/o H3K9 histone marks on t he rDNA o f
275 *nas1,2,4* compared to WT plants. In *A. thaliana*, 45S siRNA can be transcribed by Pol II from
276 the Intergenic Spacers (IGS) sequence and direct DNA methylation (Costa-Nunes et al. 2010;
277 Earley et al. 2010). However, 45S siRNA and siR759 level are not affected in *nas1,2,4* (Fig.
278 S6), suggesting t hat promoter methylation i n *nas1,2,4* could be r elated t o t he D NA
279 methylation maintenance pathway (He et al. 2011).

280

281 Despite the increased number of FC and expression of rDNA VAR1 in *nas1,2,4*, global RNA
282 pol I transcription activity seems not to be higher compared to WT plants. Indeed, northern
283 blot a nalysis indicates that the amount of pri-rRNA precursor in *nas1,2,4* is similar to WT
284 plants (Fig. S7). Then it i s pos sible t hat (hypothetically) additional transcriptional actives
285 genes (observed as FC), are less loaded on RNA pol I. This might provoke lower production
286 of rRNA transcripts per rDNA unit. Controlling rRNA synthesis by modulating the number or
287 the RNA pol I loading of rDNA units was reported in yeast and animals cells (French et al.
288 2003; Grummt 2003; Goodfellow and Zomerdijk 2013), but not yet in plants.

289

290 Primer extension experiments and sequence analysis of 5'ETS rDNA sequence (from +1 to +
291 104), indicates that rRNA VA R1 a nd 2 a re one nt longer compared to r RNA VAR 3
292 transcripts. Indeed, we identified one insertion/deletion that might generate 104 and 103 nt
293 long reverse transcribed rRNA transcripts from tis primer (Fig. 6 a nd S3). Thus, in WT the
294 two TIS signals would come from VAR2 and VAR3 while in *nas1,2,4* the single TIS signal
295 would come from VAR1 and VAR2. In agreement, in *nuc1* a single PE signal is correlated
296 with VAR1 and VAR2 expression (Fig. 1 a nd (Pontvianne et al. 2010)). While in *nuc2*, a
297 single PE signal is correlated with expression of VAR1 and down regulation of VAR3 (Durut
298 et al. 2014).

299

300 Processing of pre-rRNA and assembly of ribosome is not affected in *nas1,2,4* (Fig. S7-9). On
301 one hand, similar amount of pre-rRNA precursors are detected in WT and *nas1,2,4* plants,
302 indicating that cleavages events are not affected. Our analysis, indicates also that the specific
303 5'ETS-first pathway induced in *xrn2* plant mutants (Zakrzewska-Placzek et al. 2010) is not
304 stimulated in *nas1,2,4* (Fig. S7). On the other hand, ribosome profiles in *nas1,2,4* is neither
305 affected. The relative amount of ribosome particles and polysomal fractions are similar to WT
306 (Fig. S8). Besides, *nas1,2,4* plants do not show any specific plant growth or developmental
307 phenotype on medium conditions highlighting specific phenotypes in some mutant for
308 ribosome biogenesis factors (Fig. S9) (Im et al. 2011; Hsu et al. 2014; Huang et al. 2016).

309

310 Finally, it is important to recall that in *nas1,2,4* the number of FC is similar to WT in 5-days
311 old seedling, indicating comparable RNA pol I transcription. At this stage rDNA chromatin is
312 decondensed and rRNA variants from NOR2 and 4 are expressed (Earley et al. 2010). Then it
313 is possible to correlate rDNA VAR1 expression with a failed repression of- rather than
314 activation of- NOR2 in *nas1,2,4*. In this context it is worth mentioning that MET18
315 dysfunction, a conserved iron-sulfur cluster assembly protein is required for the full
316 enzymatic activity of ROS1/DME (Wang et al. 2016). In plants, DME remove 5mC, which is
317 then replaced by unmethylated cytosine, resulting in transcriptional activation of target genes
318 (Mok et al. 2010). More precisely, *MET18* gene disruption cause DNA hypermethylation in
319 particular in the CHH context (Wang et al. 2016). On other hand RNA Pol I contains also an
320 iron-sulfur cluster domain in AC40 subunit that likely play an structural rather a catalytic role
321 (Balk and Pilon 2011; Fernandez-Tornero et al. 2013). *Arabidopsis* plants express two AC40
322 orthologues (Ream et al. 2015), however, the functional significance of these iron-sulfur
323 cluster in rDNA gene expression remain to be investigated.

324

325 MATERIALS AND METHODS

326 Plant material and growth conditions

327 *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 Wild-Type (WT), *nas1,2,4*, *nas1,2,3*, *nas2,3,4*, *nas2,3,4*
328 (Klatte et al. 2009), *fer* (REFERENCE) and *ysl* mutants plants (REFERENCE) were grown
329 either on soil for 21 days, or *in vitro* on 1X Murashige and Skoog medium (Duchefa
330 Biochemie M0231, including Gamborg B5 vitamins, supplemented with 0,05% (w/v) MES
331 and 1% (w/v) Plant agar, pH was adjusted at 5,7 with KOH) for 15 days. For the soil grown
332 plants, only the aerial parts were collected for analysis, whereas for the *in vitro* conditions the

333 whole seedlings were analyzed. Plants were grown under an 8h/16h photoperiod (dark/light)
334 at 21°C.

335

336 **Nicotianamine (NA) analysis**

337 Approximately 0,1g of fresh 15 days-old *in vitro* plants were grinded to a fine powder in
338 liquid nitrogen and analyzed for NA amount accordingly to (Klatte et al. 2009).

339

340 **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

341 Roots from 5, 10 and 15 days old plants were first fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde in
342 0.025M cacodylate buffer (pH7.3) at room temperature. After washing, the samples were
343 post-fixed by 1% OsO₄ in the same buffer. The samples were then dehydrated in a methanol
344 series (30, 50, 70 and 100%) at room temperature. The samples were acetylated and
345 methylated with a freshly prepared 5:1 (v/v) methanol/acetic anhydride mixture at 25°C.
346 Samples were then washed in pure methanol and embedded in Epon 812 resin (**XXX**).
347 Ultrathin sections were performed on a ultramicrotome (Leica Ultracut), and counterstained
348 by uranyl acetate and lead citrate before being observed at a 7500 Hitachi TEM. Method
349 accordingly to Pontvianne et al., 2007 and Testillano et al., 1995).

350

351 **PERL/DAB (Prussian blue/3, 3 -diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate) staining**

352 Leaf fragments from 15d days-old *in vitro* seedlings were vacuum-infiltrated with the fixation
353 solution containing 2% (w/v) paraformaldehyde, 1% (v/v) glutaraldehyde, 1% (w/v) caffeine
354 in 00mM phosphate buffer (pH 7). The fixed samples were treated and analyzed according to
355 (Roschzttardtz et al. 2011).

356

357 **Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)**

358 The FISH probe containing intergenic spacer (IGS) and 5'external transcribed spacer (5'ETS)
359 rDNA sequences (-220/+250) was cloned in pGEM-T® vector (Promega) and amplified by
360 PCR using universal primers T7/M13R and supplying biotin-16-dUTP (Roche, Meylan,
361 France) to the reaction. The analysis was performed using nuclei from leaves of 21 days-old
362 plants. The biotinlabeled probe was detected using digoxigenin (1:200; Roche) followed by
363 sheep anti-digoxigenin antibody conjugated with the fluorochrome Alexa 480 (1:200;
364 Invitrogen). Slides were prepared using Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium
365 supplemented with 1μg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and then observed by

366 confocal microscopy (Axio observer.Z1 microscope with the LSM700 scanning module;
367 Zeiss). Method according to Durut et al., 2014)

368

369 **DNA and RNA isolation**

370 DNA was extracted from liquid nitrogen grinded powder by using either the DNeasy® plant
371 Mini Kit (Qiagen) or the DNA extraction, illus tra™ Nucleon™ PhytoPure™ (G E
372 Healthcare), both according to the manufacturer instructions. The GE Healthcare kit was used
373 only for bisulfite treated DNA. For RNA, around 800µL of frozen powder were supplemented
374 with 5mL of Tri Reagent® (Molecular Research Center, Inc), then 1mL of cold chloroform
375 was added. After 3 minutes incubation, the mix was centrifuge at 8,000 g for 15min at 4°C.
376 Then 3mL of cold isopropanol was added to the conserved aqueous phase and the resulting
377 product was then centrifuged at 8,000 g for 30min at 4°C. Isopropanol was replaced by 75%
378 ethanol and the mix was incubated over-night at -20°C. The pellet was dried and resuspended
379 in 65°C Diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water. DNA was removed from samples by
380 using the TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen), according to the manufacturer protocol.

381

382 **PCR, RT-PCR and qPCR**

383 PCR amplifications were made using the GoTaq® DNA Polymerase and 5X GoTaq® Green
384 buffer (Promega). PCR 3'ETS products were loaded on an agarose gel (2% agarose) in TAE
385 0,5X supplemented with Gel Red. RT-PCR were done using SuperScript I V Reverse
386 Transcriptase (ThermoFisher Scientific). For cDNA production we used simultaneously
387 Random and oligo dT primers. The protocol was performed following the manufacturer's
388 instructions. The cDNA obtained were used for PCR experiments afterwards. Quantitative
389 PCR (qPCR) was performed using a LightCycler 480 and MESA Blue qPCR Master Mix Plus
390 for SYBR assay (Eurogentec) in compliance with manufacturer procedures.

391

392 **Bisulfite DNA treatment and analysis**

393 DNA was converted (me5C to T) using the EpiTect Plus Bisulfite Conversion kit (Qiagen).
394 The target region was then amplified by PCR using the kit Ex Taq DNA polymerase, hot start
395 version (TaKaRa Bio Inc.) and specific primers 112/113 and 124/125 (to amplify respectively
396 promoter/5'ETS and 3'ETS. 3'ETS PCR products were run on an agarose gel, sliced from the
397 gel and purified using GeneClean® Turbo kit (MP Biomedicals). PCR products were ligated
398 in pGEM®-T Vector (kit from Promega). *E. coli* DH5α cells were transformed with the
399 construction and cultured on Lysogeny Broth (LB) medium supplemented with 0,1 mg/mL

400 Ampicillin and 0,04mg/mL X-Gal. Positive clones (white) were sequenced using T7 and SP6
401 primers. The sequences obtained were mapped to a reference sequence and the alignment was
402 sent to CyMATE to analyze methylation sites in the sequence. The results were analyzed using
403 prop.test function to verify significant differences thanks to R software (Durut et al. 2014).

404

405 **Primer extension**

406 Primer extension analysis was performed using 15 µg of total RNA and specific 5'end–
407 labeled primers as described previously (Saez-Vasquez et al. 2004; Pontvianne et al. 2010).
408 Primers used were “tis” for the detection of pri-rRNA precursors (+104 nt) and “p” (+1404)
409 for detection of rRNA precursors cleaved at the P site (+1273). Primer U3 was used for the
410 detection of U3snrRNA as a loading control.

411

412 **FIGURE LEGENDS**

413 **Figure 1: rRNA variant 1 expression in *nas1,2,4* plants**

414 Top, Scheme of 45S rDNA unit highlighting the 3'ETS region of rDNA VAR1-3. Red arrows
415 show primers 108/109 used to amplify 3'ETS rDNA and rRNA sequences. Blue bars show
416 18S (q18S-f/r), ITS1 (qITS1a-f/r and qITS1b-f/r), 5.8S (q5.8S-f/r) and 25S (q25S-f/r) rDNA
417 sequences amplified by qPCR with specified primers. The FISH probe encompassing rDNA
418 from –220 to +250 is shown. Bottom, RT-PCR to detect rRNA variants in leaves from 21
419 days-old WT, *nuc1.2*, *nuc2.1*, *fer*, *ysl* and *nas* triple mutant (*nas1,2,4*; *nas1,2,3*; *nas1,2,4* and
420 *nas1,3,4*) plants. Mock line is a RT-PCR without RNA. Amplification of EF1-alpha and
421 Actin2 (Act2) RNA transcripts was performed to verify similar amount of RNA in each
422 sample.

423

424 **Figure 2: Plant phenotype and loss of iron in *nas1,2,4***

425 **A)** WT and *nas1,2,4* plants grown for 21 days on soil (top panels) and 10 days *in vitro* (low
426 panels) **B)** Nicotianamine (NA) content in 15 days-old WT and *nas1,2,4* plants **C)** Epidermal
427 cells from 15 days-old WT and *nas1,2,4* plants grown *in vitro* and stained with Perls/DAB.
428 Arrowheads show nucleolar iron in *nas1,2,4* cells, arrows indicate either ferritin / iron
429 aggregates.

430

431 **Figure 3: TEM reveals higher number of Fibrillar Centers in *nas1,2,4* nucleoli.**

432 **A)** Transmission Electron Microscopy (TEM) on root cells from *in vitro* 10 days-old WT and
433 *nas1,2,4* plants. The Fibrillar Centers (FC, clear part) are surrounded by the Dense Fibrillar

434 Component (DFC, pointed by white arrows) and imbibed in the Granular Component (GC)
435 **B)** Boxplot graphs of nucleoli periphery (left) and number of FC structures per nucleolus
436 (right) in 5 (red), 10 (green) and 15 (blue) days-old root cells from *in vitro* grown plants. The
437 dots indicate the out layers samples. 28 (5 days-old), 13 (10 days-old) and 46 (15 days-old)
438 WT nucleoli and 35 (5 days-old), 19 (10 days-old) and 16 (15 days-old) *nas1,2,4* nucleoli
439 were analyzed.

440

441 **Figure 4: FISH analysis shows nucleolar association of NOR2 in *nas1,2,4***

442 45S- Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) analysis performed on leaf cells from 21 days-
443 old WT and *nas1,2,4* plants. 45S - labelled probes hybridized NOR2 and NOR4 (red signals).
444 Nucleoplasm is stained in blue with DAPI while unstained nucleolus is visualized as a black
445 hole. The histogram shows number of 45S FISH signals in (32) WT and (18) *nas1,2,4* cells.
446 Green bar show the number of nucleolus associated signals and the purple bar show nucleolus
447 non associated signals.

448

449 **Figure 5: rDNA promoter is hyper-methylated at CHG and CHH positions in *nas1,2,4***

450 **Top**, scheme of 45S rDNA to show position of primers used in bisulfite and ChIP analysis.
451 Red arrows, primers 112/113 and 124/125 for the bisulfite analyses of promoter/5'ETS (from
452 -315 to +243) and 3' ETS rDNA sequences respectively. Blue bars, 25 S (176/177), 3' ETS,
453 IGS (137/138, 178/179 and 180/181) and 5' ETS (172/173 and 174/175) rDNA sequences
454 amplified in ChIP analysis shown in Fig. S2 **Bottom**, bisulfite analysis of promoter/5'ETS
455 (from -315 to +243) rDNA sequence from 21 days-old WT and *nas1,2,4* plants. The graph
456 bars show CG (red), CHG (blue) and CHH (green) methylation level at different position in
457 the rDNA. The tiny dark stars over the graph bars indicate a significant difference of
458 methylation rate between WT and *nas1,2,4* for each position.

459

460 **Figure 6: rRNA primer extension mapping of single TIS in *nas1,2,4***

461 **A)** Scheme of rDNA to show *tis* and *p* primers located (5' end) at positions +104 and +1404.
462 Orange vertical arrow indicate P cleavage at position +1273. The deletions, in positions +40
463 and +53 observed in Fig. S3, are indicated **B)** Primer extension analysis using total RNA from
464 *nuc1*, WT, *nas1,2,4* and *nas2,3,4* plants (lanes 1-4) using primers *tis* (panel TIS) and *p* (panel
465 P) for TIS and P cleavage site mapping. Primer *u3* for U3 snoRNA detection is used as RNA
466 loading control (panel U3). G, A, T and C lanes show DNA sequencing reaction of rDNA
467 construct with the *tis* primer, used to accurately map transcript initiation site. **C)** Top

468 Histograms show relative amount (%) of 102 (red), 103 (green) and 104 (blue) nt long rDNA
469 sequences (Top) with one nt deletion (40, green or 53, blue) or two (40 and 53, magenta)
470 deletions (Bottom) in WT, *nas1,2,4* and *nas2,3,4* plants.

471

472 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

473 CM, FP, EJ, WL, AB, MLE, ADB, ML, CL, CR performed the experiments. CM took part in
474 writing the manuscript. FP and SM supervised experiments. JSV conceived, designed the
475 study and wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

476

477 **ACKNOWLEDGMENTS**

478 The authors thank XXX for critical reading of the manuscripts. We also thank Dr. WWW for
479 providing *XXX* seeds and antibodies against XX protein. This work was supported by the
480 CNRS, the UPVD (fellowships to CM), by a grant ANR SVSE2_SUBCELIF 087217 to JSV.

481

482 **REFERENCES**

- 483 Balk J, Pilon M. 2011. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants.
484 *Trends Plant Sci* **16**: 218-226.
- 485 Boulon S, Westman B J, Hutter S, Boisvert F M, Lamond A I. 2010. The nucleolus under stress.
486 *Mol Cell* **40**: 216-227.
- 487 Briat JF, Dubos C, Gaymard F. 2015. Iron nutrition, biomass production, and plant product
488 quality. *Trends Plant Sci* **20**: 33-40.
- 489 Chandrasekhara C, Mohannath G, Blevins T, Pontvianne F, Pikaard CS. 2016. Chromosome-
490 specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control
491 in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **30**: 177-190.
- 492 Copenhaver G P, Pikaard C S. 1996a. RFLP analysis reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin
493 the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* **9**: 259-272.
- 494 -. 1996b. Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*, suggesting local spreading of variants as the mode for
495 gene homogenization during concerted evolution. *Plant J* **9**: 273-282.
- 496 Costa-Nunes P, Pontes O, Preuss SB, Pikaard C S. 2010. Extra views on RNA-dependent
497 DNA methylation and MBD6-dependent heterochromatin formation in nucleolar dominance.
498 *Nucleus* **1**: 254-259.
- 500 Doelling JH, Pikaard CS. 1995. The minimal ribosomal RNA gene promoter of *Arabidopsis thaliana* includes a critical element at the transcription initiation site. *Plant J* **8**: 683-692.
- 501 Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA,
502 Wormsley S, Settlage RE, Shabanowitz J, Osheim Y et al. 2002. A large nucleolar U3
503 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**: 967-970.
- 504 Duc C, Benoit M, Detourne G, Simon L, Poulet A, Jung M, Veluchamy A, Latrasse D, Le
505 Goff S, Cotterell S et al. 2017. *Arabidopsis* TRX Modulates H3.3 Occupancy and
506 Fine-Tunes Gene Expression. *Plant Cell* **29**: 1773-1793.
- 507 Durut N, Abou-Ellaïl M, Pontvianne F, Das S, Kojima H, Ukai S, de Bures A, Comella P,
508 Nidelet S, Rialle S et al. 2014. A duplicated NUCLEOLIN gene with antagonistic
509 activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*.
510 *Plant Cell* **26**: 1330-1344.
- 511 Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas
512 W, Pikaard CS. 2006. Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates
513 large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* **20**: 1283-1293. Epub
514 2006 Apr 1228.
- 515 Earley K W, Pontvianne F, Wierzbicki A T, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O,
516 Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression
517 of transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* **24**: 1119-1132.
- 518 Ebersberger I, Simm S, Leisegang MS, Schmitzberger P, Mirus O, von Haeseler A, Bohnsack
519 MT, Schleiff E. 2014. The evolution of the ribosome biogenesis pathway from a yeast
520 perspective. *Nucleic Acids Res* **42**: 1509-1523.
- 521 Espada J, Ballesiar E, Santoro R, Fraga M F, Villar-Garea A, Nemeth A, Lopez-Serra L,
522 Ropero S, Aranda A, Orozco H et al. 2007. Epigenetic disruption of ribosomal RNA
523 genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells.
524 *Nucleic Acids Res* **35**: 2191-2198.
- 525 Fatica A, Tollervey D. 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 313-318.

- 530 Fernandez-Tornero C, Moreno-Morcillo M, Rashid U J, Taylor N M, Ruiz F M, Gruene T,
531 Legrand P, Steuerwald U, Muller CW. 2013. Crystal structure of the 14-subunit RNA
532 polymerase I. *Nature* **502**: 644-649.
- 533 Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer T C, Torres-Ruiz R A, Jones G. 1998.
534 Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **13**: 867-876.
- 535 Fransz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. 2002. Interphase chromosomes
536 in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin
537 loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14584-14589.
- 538 French S L, Osheim Y N, Cioci F, Nomura M, Beyer A L. 2003. In exponentially growing
539 *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA
540 polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* **23**:
541 1558-1568.
- 542 Fromont-Racine M, Enger B, Aveanu C, Asiolo F. 2003. Ribosome assembly in
543 eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42.
- 544 Goodfellow SJ, Zomerdijk JC. 2013. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of
545 the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem* **61**: 211-236.
- 546 Grillet L, Mari S, Schmidt W. 2014. Iron in seeds - loading pathways and subcellular
547 localization. *Front Plant Sci* **4**: 535.
- 548 Grummt I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in
549 the nucleolus. *Genes Dev* **17**: 1691-1702.
- 550 Hantzis LJ, Kroh GE, Jahn CE, Cantrell M, Peers G, Pilon M, Ravet K. 2018. A Program for
551 Iron Economy during Efficiency Targets Specific Functions. *Plant Physiol* **176**:
552 596-610.
- 553 He XJ, Chen T, Zhu JK. 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and
554 animals. *Cell Res* **21**: 442-465.
- 555 Heaney MM, Finberg KE. 2014. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol
556 Oncol Clin North Am* **28**: 637-652, v.
- 557 Henle ES, Han Z, Tang N, Rai P, Luo Y, Linn S. 1999. Sequence-specific DNA cleavage by
558 Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* **274**:
559 962-971.
- 560 Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. 1996. Oxidative damage to DNA constituents by
561 iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J Biol Chem* **271**: 21177-
562 21186.
- 563 Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. 2010. The nucleolus:
564 structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**: 415-
565 431.
- 566 Honda K, Smith MA, Zhu X, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, Hattier T, Harris PL,
567 Siedlak SL, Fujioka H et al. 2005. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized
568 by bound redox-active iron. *J Biol Chem* **280**: 20978-20986.
- 569 Hsu YF, Chen YC, Hsiao YC, Wang BJ, Lin SY, Cheng WH, Jauh GY, Harada JJ, Wang CS.
570 2014. A tRH57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of
571 glucose-mediated activation accumulation during seedling development and
572 additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose. *Plant J* **77**: 119-
573 135.
- 574 Huang CK, Shen YL, Huang LF, Wu SJ, Yeh CH, Lu CA. 2016. The DEAD-Box RNA
575 Helicase AtRH7/PRH75 Participates in Pre-rRNA Processing, Plant Development and
576 Cold Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **57**: 174-191.
- 577 Im CH, Hwang SM, Son YS, Heo JB, Bang WY, Suwastika IN, Shiina T, Bahk JD. 2011.
578 Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of YlpF/YawG GTPases function

- 579 in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants. *J Biol*
580 *Chem* **286**: 8620-8632.
- 581 Klatte M , Schuler M , Wirtz M , Fink-Straube C, Hell R , Bauer P . 2009. The analysis of
582 Arabidopsis ni cotianamine synthase mutants reveals functions for ni cotianamine in
583 seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol* **150**: 257-271.
- 584 Kumar N , Rizek P , Jogg M . 2016. Neuroferritinopathy: Pathophysiology, Presentation,
585 Differential Diagnoses and Management. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* **6**: 355.
- 586 Layat E, Saez-Vasquez J, Tourmente S. 2012. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and
587 Pol III-transcribed 5S rDNA in arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **53**: 267-276.
- 588 Merai Z , Chumak N, Garcia-Aguilar M , Hsieh T F, Nishimura T , Schucht V K, Bindics J,
589 Slusarz L, Arnoux S, Opravil S et al. 2014. The AAA-ATPase molecular chaperone
590 Cdc48/p97 disassembles sumoylated centromeres, decondenses heterochromatin, and
591 activates ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 16166-16171.
- 592 Mohannath G, Pontvianne F, Pikaard CS. 2016. Selective nucleolus organizer inactivation in
593 Arabidopsis is a chromosome position-effect phenomenon. *Proc Natl Acad Sci U S A*
594 **113**: 13426-13431.
- 595 Mok YG, Uzawa R, Lee J, Weiner GM, Eichman BF, Fischer RL, Huh JH. 2010. Domain
596 structure of the DEMETER 5-methylcytosine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U*
597 *S A* **107**: 19225-19230.
- 598 Mozgova I, Mokros P, Fajkus J. 2010. Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces
599 shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**:
600 2768-2780.
- 601 Pederson T, Powell K. 2015. Thoru Pederson: Spotting novel roles for the nucleolus. *J Cell*
602 *Biol* **208**: 384-385.
- 603 Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A,
604 Blevins T , Cooke R , Medina F J et al. 2010. Nucleolin is required for DNA
605 methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana.
606 *PLoS Genet* **6**: e1001225.
- 607 Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD,
608 Pikaard CS. 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage
609 control in Arabidopsis. *Genes Dev* **26**: 945-957.
- 610 Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Mozgova I, Hassel C, Pontes OM, Tucker S,
611 Mokros P, Muchova V, Fajkus J et al. 2013. Subnuclear partitioning of rRNA genes
612 between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev*
613 **27**: 1545-1550.
- 614 Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S , Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J.
615 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus
616 organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **18**: 369-
617 379.
- 618 Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS,
619 Murfett J, Furner I et al. 2004. Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for
620 maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of
621 rDNA repeats. *Plant Cell* **16**: 1021-1034.
- 622 Quintana C, Bellefqih S, Laval JY, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Avila J, Ferrer I, Arranz R,
623 Patino C . 2006. Study of the localization of ferritin, and hemosiderin in
624 Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J*
625 *Struct Biol* **153**: 42-54.
- 626 Ream TS, Haag JR, Pontvianne F, Nicora CD, Norbeck AD, Pasa-Tolic L, Pikaard CS. 2015.
627 Subunit compositions of Arabidopsis RNA polymerases I and III reveal Pol I- and Pol

- 628 III-specific forms of the A C40 subunit and alternative forms of the C53 subunit.
629 *Nucleic Acids Res* **43**: 4163-4178.
- 630 Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, Briat JF. 2015. Iron- and ferritin-dependent
631 reactive oxygen species distribution: impact on Arabidopsis root system architecture.
632 *Mol Plant* **8**: 439-453.
- 633 Rodriguez-Celma J, Pan IC, Li W, Lan P, Buckhout TJ, Schmidt W. 2013. The transcriptional
634 response of Arabidopsis leaves to Fe deficiency. *Front Plant Sci* **4**: 276.
- 635 Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure MP, Conejero G, Ortega R, Curie C, Mari S. 2011. Plant
636 cell nucleolus as a hot spot for iron. *J Biol Chem* **286**: 27863-27866.
- 637 Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M. 2004. A plant snoRNP
638 complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for
639 both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol* **24**: 7284-
640 7297.
- 641 Saez-Vasquez J, Medina FJ. 2008. The plant nucleolus. in *Botanical Research: Incorporating
642 Advances in Plant Pathology, Vol 47* (eds. J-C Kader, M Delseny), pp. 1-46. Elsevier
643 Academic Press Inc, San Diego.
- 644 Sanchez-Garcia AB, Aguilera V, Micol-Ponce R, Jover-Gil S, Ponce MR. 2015. Arabidopsis
645 MAS2, an Essential Gene That Encodes a Homolog of Animal NF-kappa B Activating
646 Protein, Is Involved in 45S Ribosomal DNA Silencing. *Plant Cell* **27**: 1999-2015.
- 647 Sloan KE, Warda AS, Sharma S, Entian KD, Lafontaine DLJ, Bohnsack MT. 2017. Tuning
648 the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis
649 and function. *RNA Biol* **14**: 1138-1152.
- 650 Stepinski D. 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* **251**: 1285-
651 1306.
- 652 Tsai RY, Pederson T. 2014. Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease.
653 *Faseb J* **28**: 3290-3296.
- 654 Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. 2017. The Nucleolus: In Genome Maintenance
655 and Repair. *Int J Mol Sci* **18**.
- 656 Wang J, Lan P, Gao H, Zheng L, Li W, Schmidt W. 2013. Expression changes of ribosomal
657 proteins in phosphate- and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific
658 alterations in ribosome composition. *BMC Genomics* **14**: 783.
- 659 Wang X, Li Q, Yuan W, Cao Z, Qi B, Kumar S, Li Y, Qian W. 2016. The cytosolic Fe-S
660 cluster assembly component MET18 is required for the full enzymatic activity of
661 ROS1 in active DNA demethylation. *Sci Rep* **6**: 26443.
- 662 Weis BL, Kovacevic J, Missbach S, Schleiff E. 2015. Plant-Specific Features of Ribosome
663 Biogenesis. *Trends Plant Sci*.
- 664 Zakrzewska-Placzek M, Sorensen F, Sobczyk GJ, Green PJ, Kufel J. 2010. Arabidopsis
665 thaliana XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic
666 Acids Res* **38**: 4487-4502.
- 667

Figure 1 : rRNA variant 1 expression in *nas1,2,4* plants

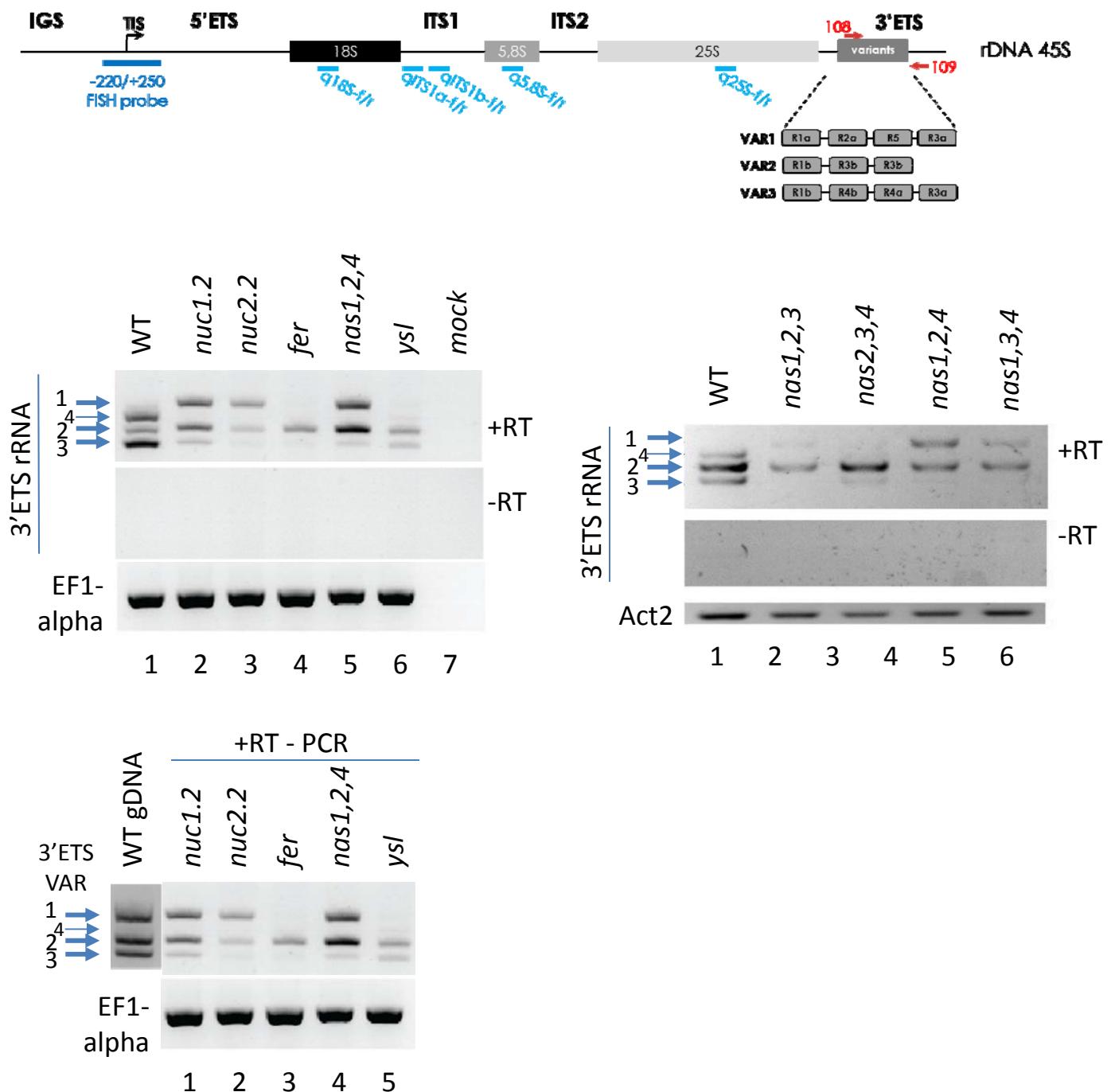


Figure 2 : Plant phenotype and loss of iron in *nas1,2,4*

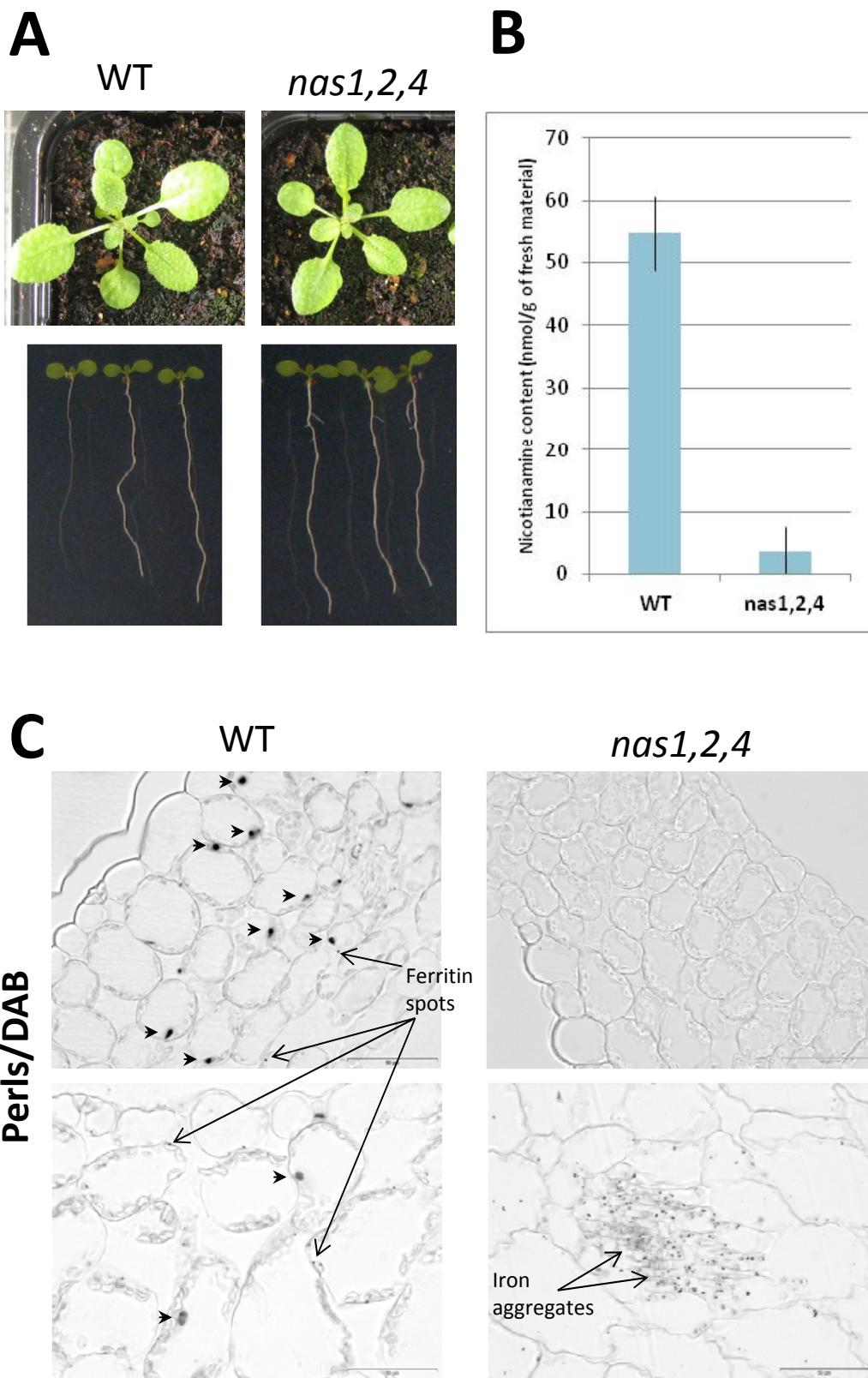
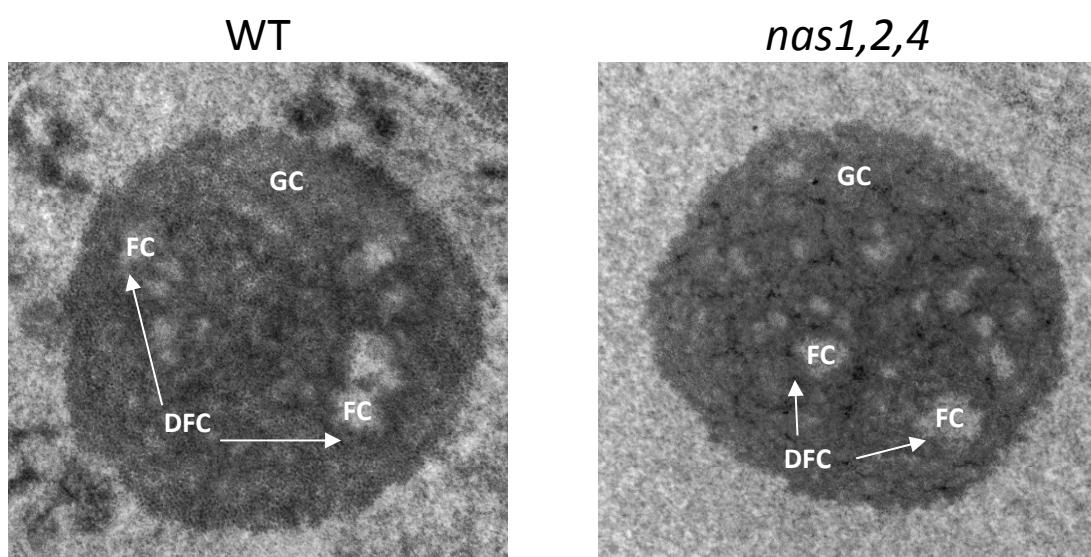


Figure 3 : TEM reveals higher number of Fibrillar Centers in *nas1,2,4* nucleoli

A



B

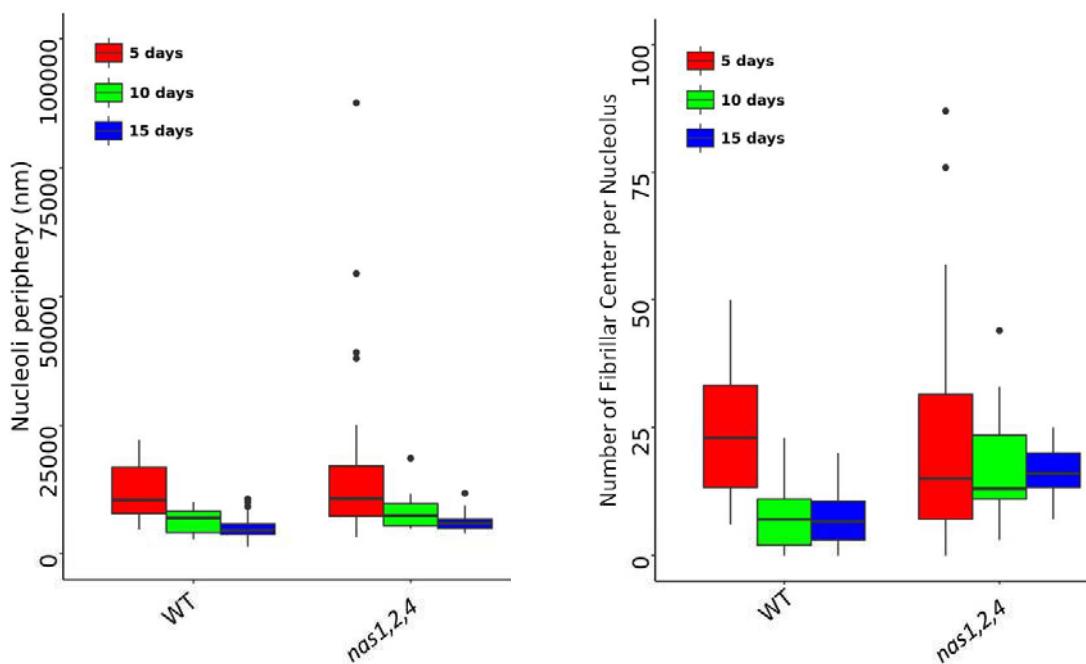


Figure 4 : FISH analysis shows nucleolar association of NOR2 in *nas1,2,4*

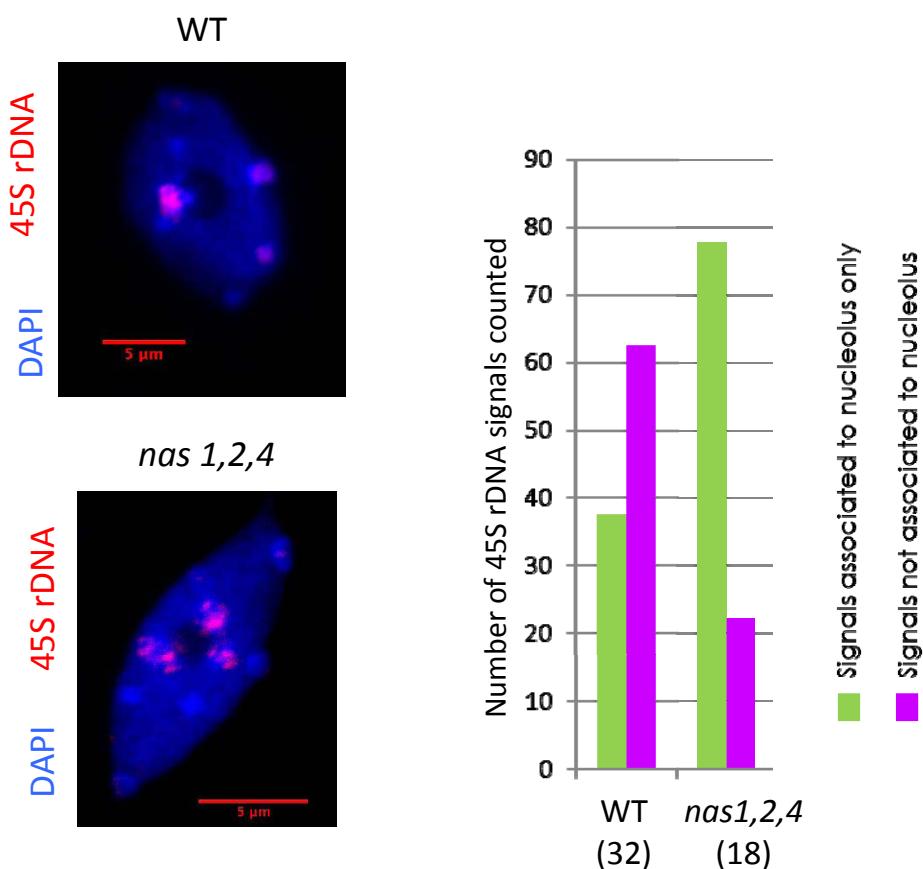


Figure 5 : rDNA promoter is hyper-methylated at CHG and CHH positions in *nas1,2,4*

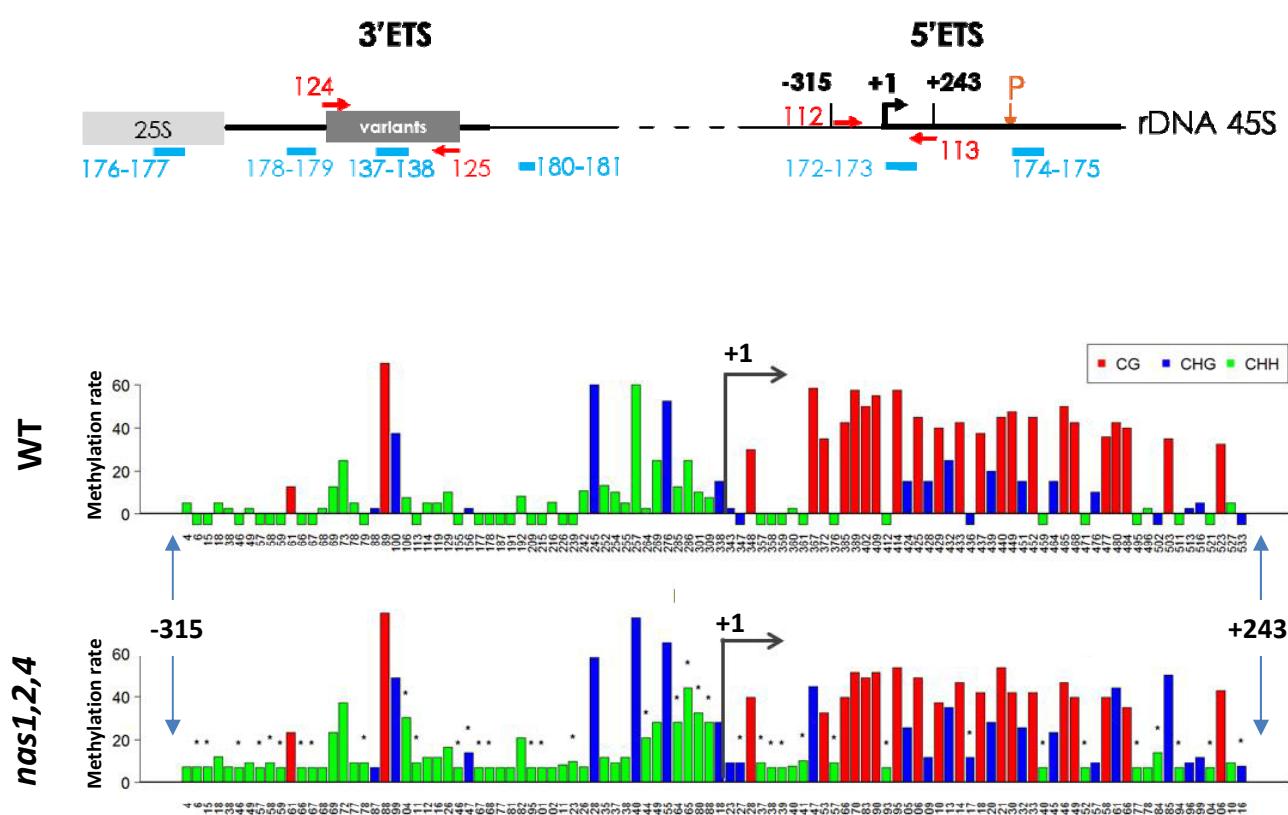
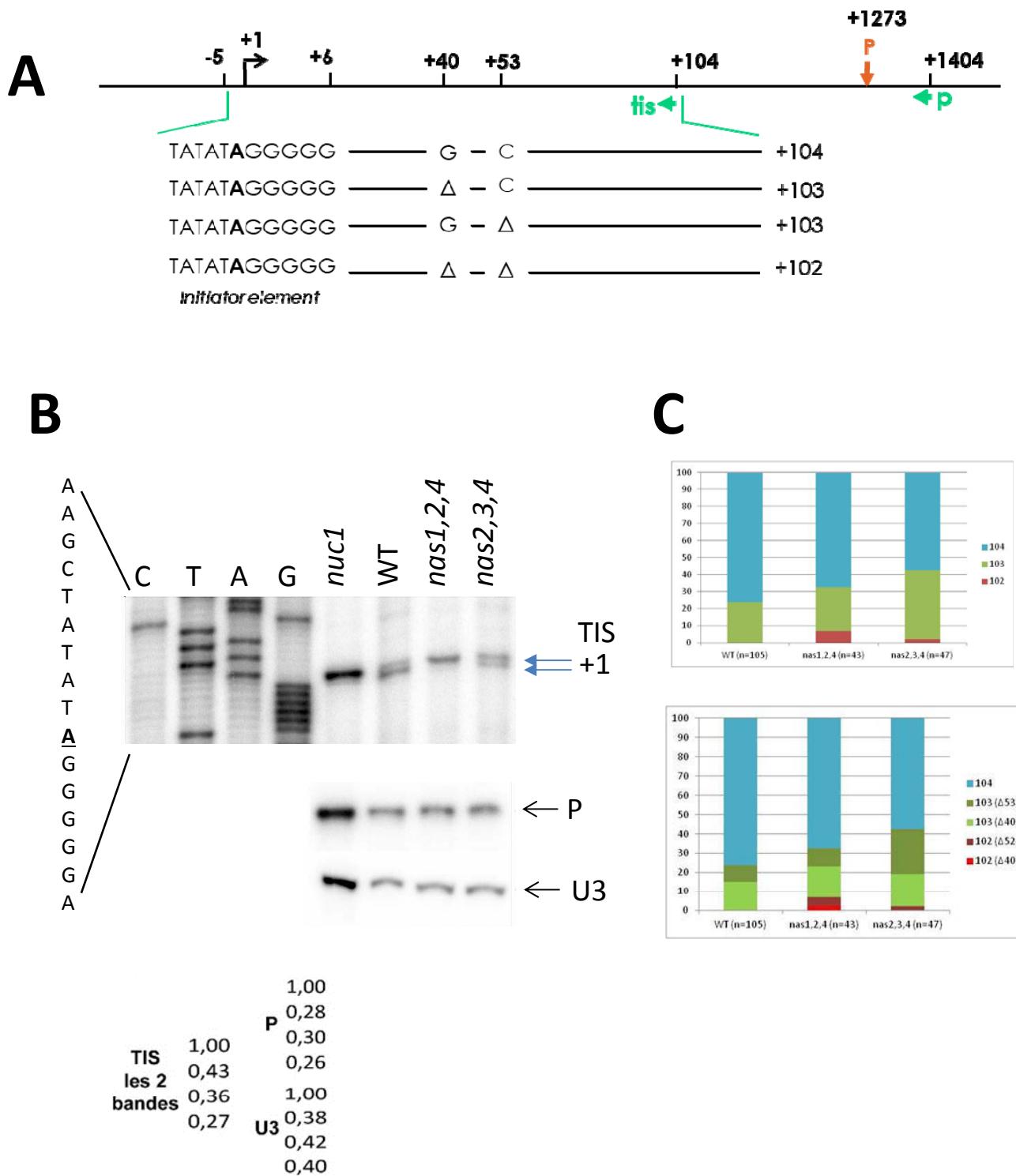


Figure 6 : rRNA primer extension mapping of single TIS in *nas1,2,4*



SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

For WT, *nas1,2,4* and *nas2,3,4* treatments experiments, MS medium was supplemented with either 2 μ g/mL Cycloheximide, 10 μ g/mL Chloramphenicol, 50 μ g/mL Streptomycin (Fig. S9) or either 4,5% (w/v) Mannitol, 4,5% (w/v) Glucose , 2mM Citric acid – 500 μ M FeCl3 or 100 μ M Ferrozine (Fig.S4). Also an MS medium M 0231, including Gamborg B 5 vitamins was home made without FeNaEDTA.. Plants were grown under an 8h/16h photoperiod (dark/light) at 21°C.

Chromatin isolation

About 3g of frozen powder were resuspended in 15mL Honda buffer (0,44M Sucrose, 1,25% (w/v) Ficoll, 2,5% (w/v) Dextran T 40, 20 mM Hepes KOH (pH7,4), 10 mM MgCl2, 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,5mM DTT) supplemented with 1 tablet/50mL Complete Maxi, EDTA-free protease inhibitor (Roche). The mix was filtered on Miracloth (Millipore) and 1% formaldehyde solution (37% formaldehyde in 10-15% methanol stabilizer) was added to the filtrate. The cross-link was stopped by adding 1:10 (v/v) glycine solution (1,25N of glycine in Honda buffer). The samples were centrifuged at 2,000 x g for 15 min at 4°C and the pellet, containing nuclei, was resuspended in nuclear lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 8), 10mM EDTA, 1% SDS) supplemented with 1 tablet/10mL Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor (Roche). Samples were then sonicated in a Bioruptor UCD-200 on high position (30sec sonication and 1min pause, 6 times).

Chromatin ImmunoPrecipitation

Extracted chromatin was ten-fold diluted in ChIP dilution buffer (1,1% (v/v) Triton X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl (pH8), 167mM NaCl) and incubated over night at 4°C with antibodies against H3pan, H3K9me2, H3K4me2 and H3Ac (Merck-Millipore).

25 μ L Protein A and 25 μ L Protein G Dynabeads (Invitrogen) were resuspended in 150mM binding buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8), 2mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% SDS). 50 μ L of the Dynabeads mixture were added to each sample, which were incubated for 60 minutes at 4°C . The mixture was washed with 500 mM binding buffer (500mM NaCl instead of 150mM) and then with TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA). The supernatant was replaced by 100 μ L 10% Chelex (BioRad). The Chelex-beads mixture was boiled in heating block at 95°C. 1 μ L Proteinase K (20mg/mL) was added and the

samples were then incubated for 90 minutes at 55°C. The incubation was stopped by heating at 95°C. The samples were centrifuged at full speed during 1min and the clear supernatant was conserved. 1µL of supernatant was used for RT-qPCR reactions.

Northern blot

3µg of RNA in 100% formamide and loading buffer (2,1X TT buffer (50X : 1,5M Tricine, 1,5M Triethanolamine), 50mM EDTA, 0,4 g/mL Bromophenol blue) solution were denaturized at 70°C, loaded on a 1% agarose gel and 3.7% formaldehyde (supplemented with 0.05 µL/mL Gel Red) and migrated in 1X TT buffer. The RNA were transferred on Hybond™-N+ membrane (GE Healthcare) in 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M Na-citrate, pH 7.0) solution and cross-linked using the Stratalinker (VVVVVV). The membrane was incubated in 1X PerfectHyb Plus Hybridization Buffer (Sigma) at 42°C with 5' end-labelled probes listed in table S1. Oligos probes were end-labelled using T4 Polynucleotide Kinase (Promega) and ³²P-γ-ATP (PerkinElmer ?). The labeled-probe and non-incorporated ³²P * gamma-ATP were separated by centrifugation on Illustra MicroSpin G -25 Columns (GE Healthcare). Hybridization with purified were performed overnight at 4°C. The hybridization signal were analyzed on a Personal Molecular Imager (BioRad).

Sucrose gradients

250 mg of leaves frozen powder from 21 days-old plant were resuspended in 750 µL of extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 9.0; 0.2 M KCl, 0.035 M MgCl₂, 0.025 M EGTA, pH 8.0) supplemented with 1% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich D6750); 1% detergent mix (0.5 g Brij-35; 0.5 mL Triton X100; 0.5 mL Igepal; 0.5 mL Tween 20); 2% polyoxyethylene 10 tridecyl ether; 5 mM DTT; 10 µM MG132; 50 µg·mL⁻¹ chloramphenicol; 100 µg·mL⁻¹ cycloheximide; and 100 µL enzymatic cocktail (Sigma-Aldrich P9599) for 10 mL of buffer. Samples were incubated in ice for 10 min and centrifuged at max speed to remove debris. Then 360 µL of supernatant were layered onto a 9 mL linear 15-60% sucrose gradient, and centrifuged in a Beckman SW41 rotor at 38,000 rpm for 3 hours at 4°C. Gradients were fractionated using the Type 11 Optical Unit (Teledyne ISCO) system, attached to a UA-6 UV/VIS Detector (Teledyne ISCO) with continuous monitoring of the absorbance at 254 nm.

Catalase (CAT) and Ascorbate peroxidase (APX) activities

100 mg of leaves frozen powder from 21 days-old plant were resuspended in 300 µL of 50mM Tris-HCl pH 7. The H₂O₂ was detected at 240nm wavelength in quartz cell. For

catalase activity analysis, 2mL of 50 mM Tris-HCl pH 7 and 40µL of H₂O₂ were supplemented with 2 µL, 4µL, 8µL, 16µL of sample. For ascorbate peroxidase analysis, 2mL of 50 mM Tris-HCl pH7, 10µL of 100 mM Ascorbate and 20µL of 10 mM H₂O₂ were supplemented with 100µL of sample.

DAB staining (3,3 -diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate)

Five 15 days-old plant were divided into 5mL MES/DAB solution (20mL of 0,5 mg/mL MES pH5,7 and 1mL of heated DAB) and placed at 30°C and under vacuum for solution infiltration. Chlorophyll was rinsed by 75° ethanol baths.

1 **SUPPLEMENTARY FIGURES**

2 **Figure S1: rDNA organization in in *nas1,2,4*.**

3 A) RT-PCR to detect rRNA variants in leaves from 21 days-old WT, *nuc1.2*, *nas1* simple and
4 *nas1,2,4* and *nas2,3,4* triple mutant plants. PCR amplification of rDNA VAR from WT plants
5 is used as size markers of rRNA VAR1 - 3. **B)** PCR and qPCR analysis to determine ratio of
6 rDNA variants and relative 45S rDNA copy number in *nas1,2,4* and sibling (G1 and G4).

7

8 **Figure S2: 3'ETS methylation and H3 histone marks in *nas1,2,4***

9 **A)** The graph bars show CG (red), CHG (blue) and CHH (green) methylation level in the
10 3'ETS regions from VAR2 and 3. The tiny dark stars over the graph bars indicate a significant
11 difference of methylation rate between WT and *nas1,2,4* for each position. The repeat boxes
12 in the VAR1 – 3 sequence are indicated. The vertical arrow point the differentially methylated
13 site in rDNA VA R1. **B)** ChIP experiment was performed using WT (blue) and *nas1,2,4*
14 (orange) chromatin and antibodies against permissive (H3K4m2 and H3Ac) and non -
15 permissive (H3K9m2) transcription marks. The histograms show relative enrichment of each
16 mark at specific positions. Amplified rDNA sequences and primers used in the ChIP
17 experiment are shown in Fig. 5. Amplification of actin and solo LTR serves respectively as
18 permissive and non-permissive chromatin control.

19

20 **Figure S3: Sequence alignment of 5' ETS r DNA (from -5 to + 104) to show single**
21 **nucleotide insertion/deletion at +40 and +53 positions**

22 The black arrow indicates the Transcription Initiation Site (TIS, +1). The primer used for
23 primer extension experiment is highlighted in purple (tis primer). Positions +40 and +53 are
24 indicated in orange. Sites of frequent punctual mutation are highlighted in blue, positions +51
25 and +97.

26

27 **Figure S4: Growth of *nas1,2,4* in absence or excess of iron**

28 Plants were grown on MS1X medium alone (mock) or supplemented with 2mM Citrate
29 (Control), 2mM-500μM Citrate-Iron (Iron excess) or 100μM Ferrozine (chelating agent of
30 Fe2+ ions). There is no difference in plant growth between WT and *nas1,2,4* genotypes.

31

32 **Figure S5: Redox**

33 **A)** Enzymatic activities of H2O2 detoxification in plants. On the left, the histogram
34 representing the Catalase activity. On the right, the histogram representing the Ascorbate

35 peroxidase activity. There is no difference between WT (blue) and *nas1,2,4* (orange) 21das
36 plants for both those enzymes. Whereas *nas2,3,4* (green) plants present lower activities than
37 WT and *nas1,2,4*, for those two enzymes. **B)** DAB staining of 10 das *in vitro* plants. DAB is
38 used to highlight presence of H₂O₂ in plants. There is no significant difference between WT
39 (*upper left*), *nas1,2,4* (*upper right*) and *nas2,3,4* (*down left*) plants.

40

41 **Figure S6: Accumulation of 45S siRNA.**

42 **A)** Scheme of 45S rDNA to show siRNA target sequences position in the IGS (Intergenic
43 Spacer). Black arrows indicate Spacer Promoter 1 and 2 (SP1 or SP2) in the IGS and the Gene
44 Promoter (G P) containing Transcription Initiation Site (T IS). Green bars indicate relative
45 positions of primer probes to detect siR759 and 45S siRNAs. **B)** Northern blot of total RNA
46 from 21 days-old W T, *nas1,2,4* and *nas2,3,4* leaves. RNA were migrated on 17.5%
47 polyacrylamide (19:1) gel, transferred on membrane and hybridized with primer labelled
48 probes 45Sprom. and siR759.

49

50 **Figure S7: Processing of rRNA precursors is not affected in *nas1,2,4***

51 **Top**, scheme of 45S primary transcript (45S pri-rRNA) processing into mature 18S, 5.8S and
52 25S rRNA. Orange arrows indicates main cleavage sites in the 5'ETS and 3'ETS (External
53 Transcribed Spacer) and in the ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacer). Reported and
54 predicted pre-rRNA are illustrated. Specific cleavage products from 5'ETS-first (blue) or
55 ITS1-first (yellow) pathways are highlighted. Green bars in the 45S pri-rRNA show relative
56 position of primer p23, p43, p5, p6 and p18S, p25S used to detected rRNA precursor and
57 mature forms. **Bottom**, Northern blots of rRNA precursors and mature forms in leaves from
58 21 days-old WT (lane 1) and *nas1,2,4* (lane 2) and *nas2,3,4* (lane 3) plants. The detected pre-
59 rRNA are indicated on the right. Red stars show unassigned forms detected by p23 and p5.
60 While blue triangle show unassigned forms detected with p6 probe and in Sikorski et al., 2015
61 ; and the other (green diamond) might correspond to cleaved 3'ETS. The Red Gel and the
62 p25S/p18S probes are used as RNA loading and mature rRNAs accumulation controls, as well
63 as marker size.

64

65 **Figure S8: Ribosome profiling is not impacted in *nas1,2,4***

66 Sucrose linear gradients (15-60%) fractionation of leaves extracts from 21 days-old WT (left)
67 and *nas1,2,4* (top) or WT and *nas2,3,4* (bottom) plants. In the figure are designated peaks

68 that might correspond to 40S and 60S (precursor and mature forms), 80S (monosome), 90S
69 (the largest pre-ribosome particle) and polysomes.

70

71 **Figure S9: Growth of *nas1,2,4* and *nas2,3,4* on antibiotic and sugar conditions**

72 **Top**, plants grown on MS1X medium supplemented with 50 μ g/mL Streptomycine, 50 μ g/mL
73 Spectinomycine, 2 μ g/mL Cycloheximide and 10 μ g/mL Chloramphenicol. **Bottom**; plants
74 grown on MS1X medium without sugar or with 4.5% mannitol or Glucose

75

76 **Figure S10: rDNA functional organization is not affected in *nas2,3,4***

77 **A)** 45S–FISH analysis in leaf cells from 21 days-old *nas2,3,4* plants and histogram show
78 number of 45S signals associated, or not, to the nucleolus in 32 WT and 17 *nas2,3,4* cells.
79 The green bar shows number of nucleolus associated signals and the purple bar shows non
80 associated signals. **B)** PCR and qPCR to determine ratio of rDNA variants and relative
81 number of 45S rDNA copies in *nas2,3,4* G1 and G4 siblings. **C)** Bisulfite analysis of rDNA
82 promoter and 5'ETS region from *nas2,3,4*. The graph bars show CG (red), CHG (blue) and
83 CHH (green) methylation positions. Primers positions for PCR, RT-PCR and bisulfite
84 experiments are depicted in main Figures 4 and 5.

Figure S1 : rDNA organization in *nas1,2,4*

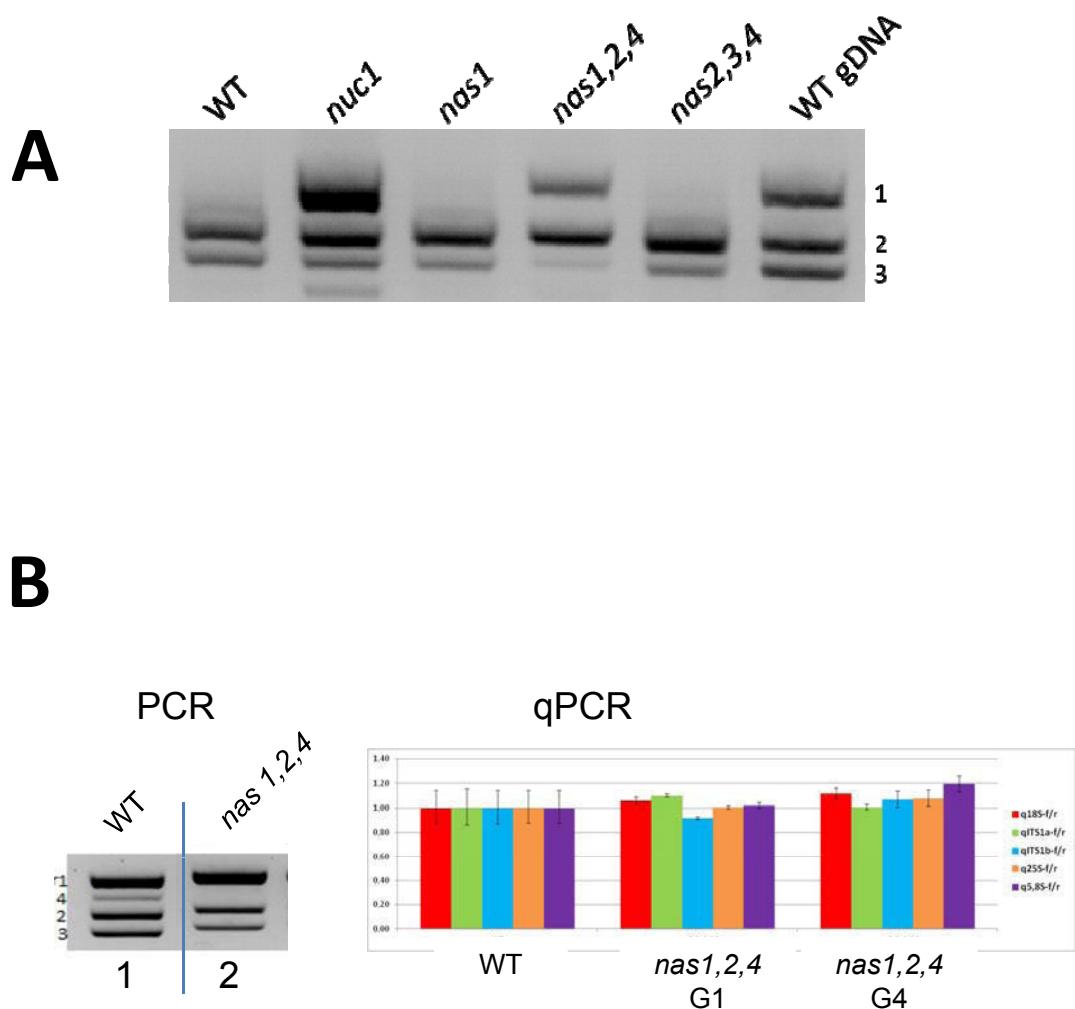


Figure S2A : 3'ETS methylation in *nas1,2,4*

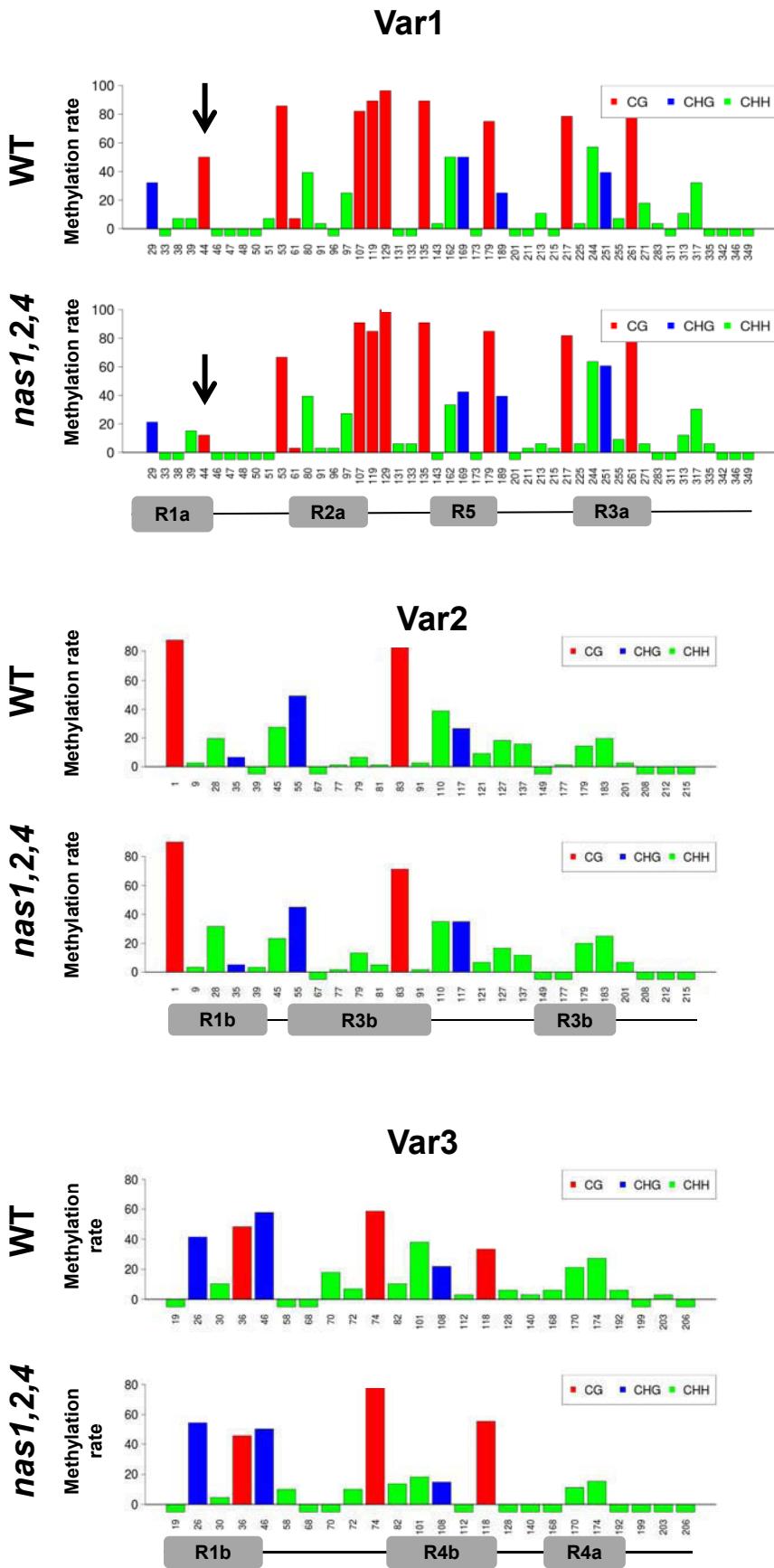


Figure S2B : H3 histone marks in *nas1,2,4*

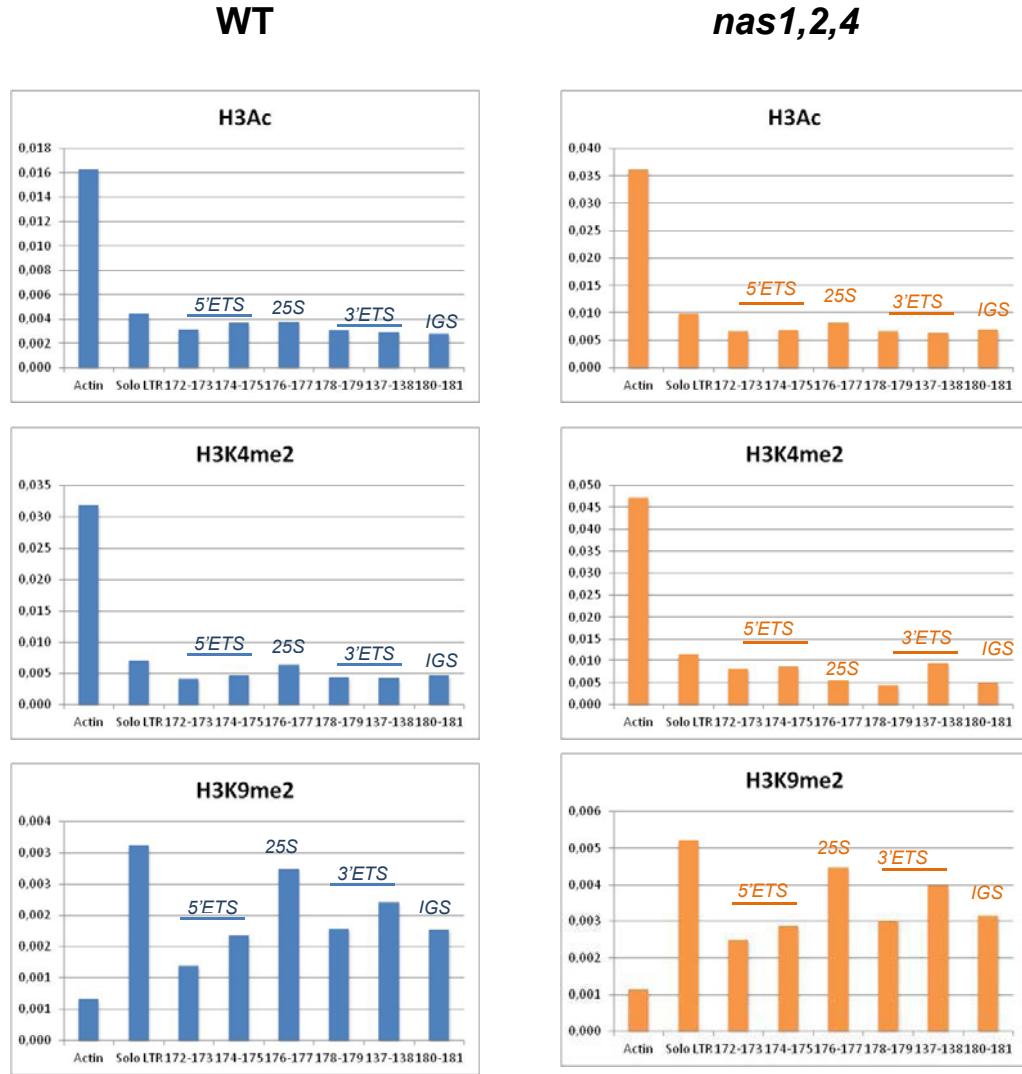


Figure S3 : Sequence alignment of 5'ETS rDNA (from -5 to +104) to show single nucleotide deletion at +40 and +53 positions

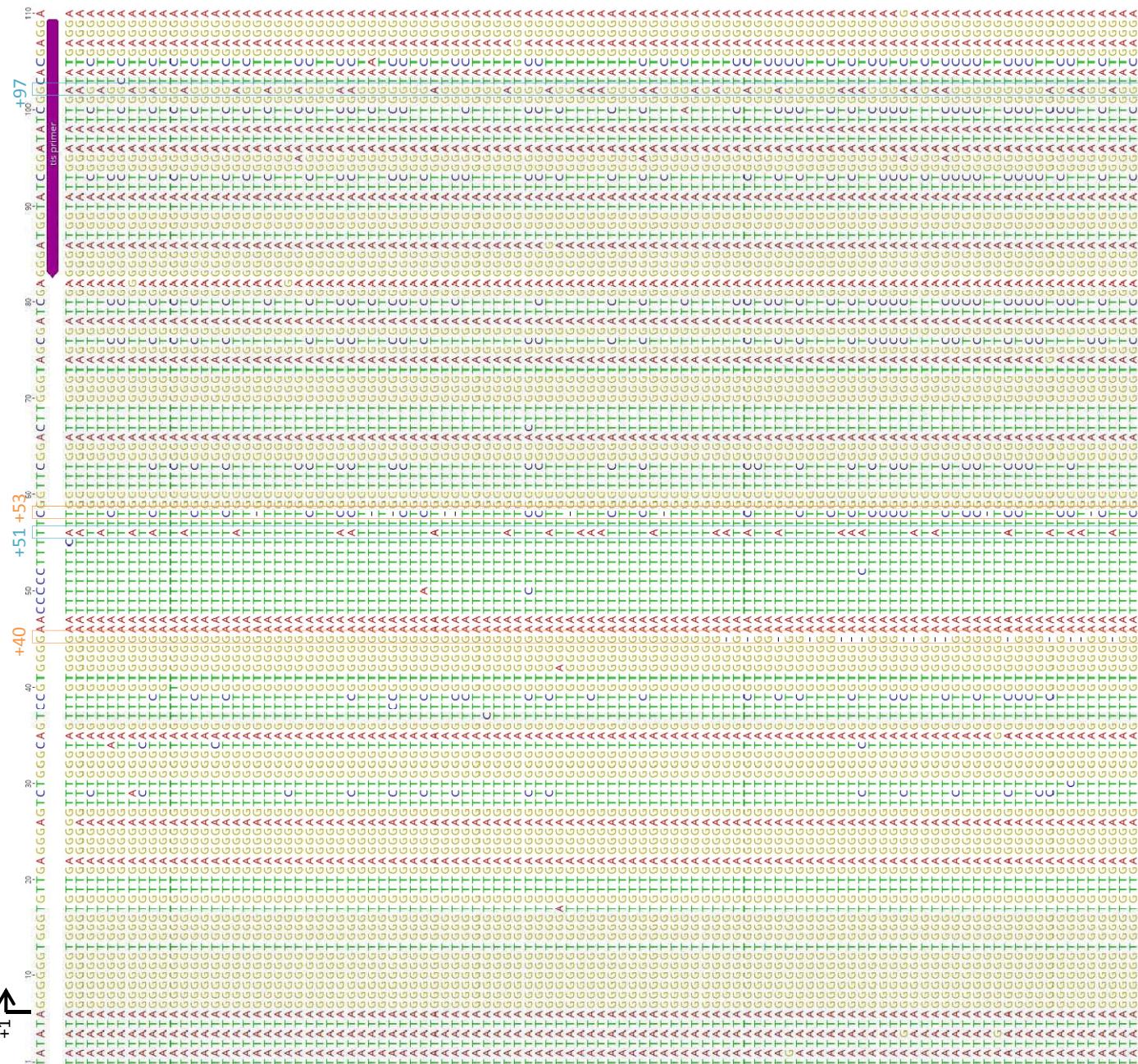


Figure S4 : Growth of *nas1,2,4* in absence or excess of iron

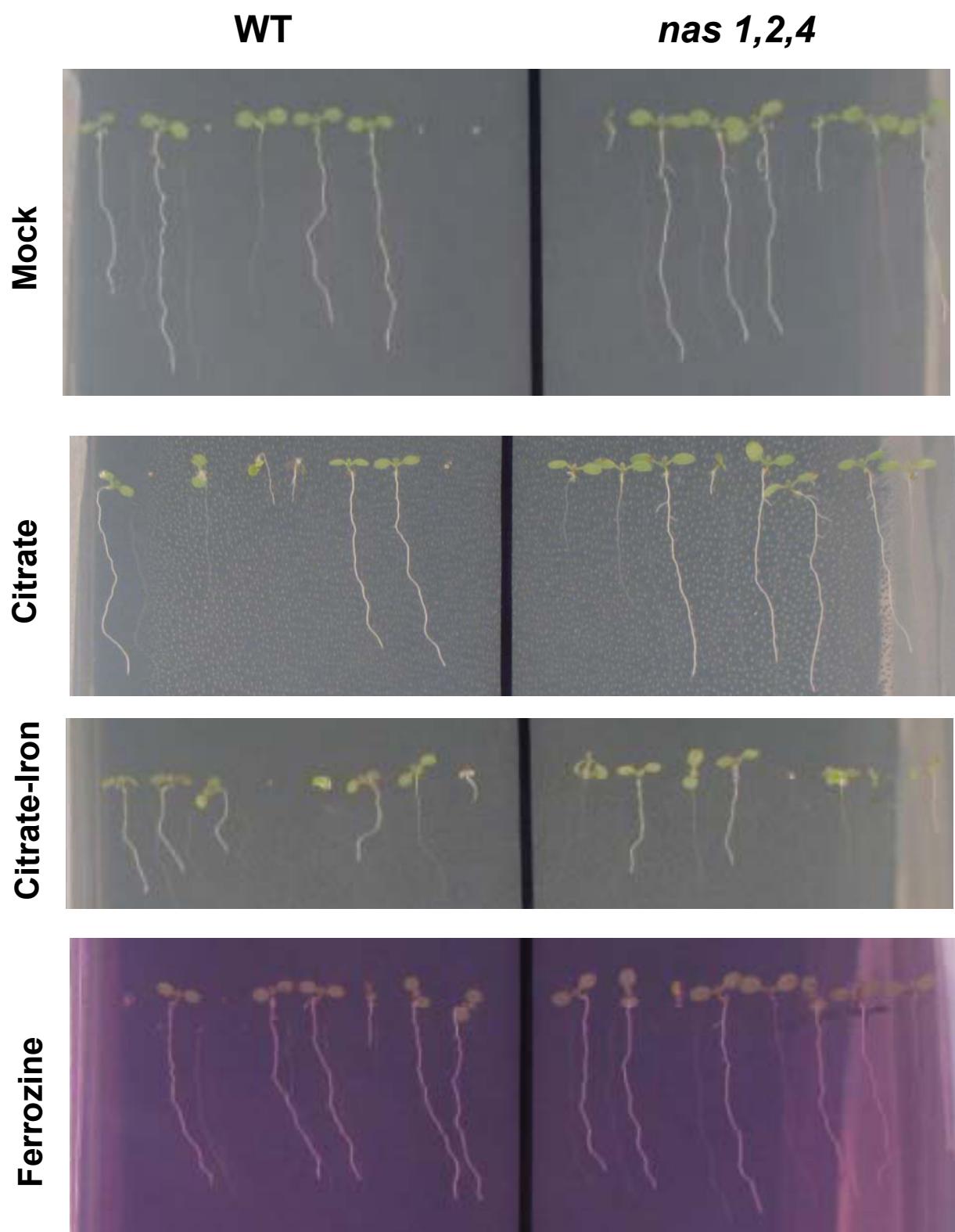
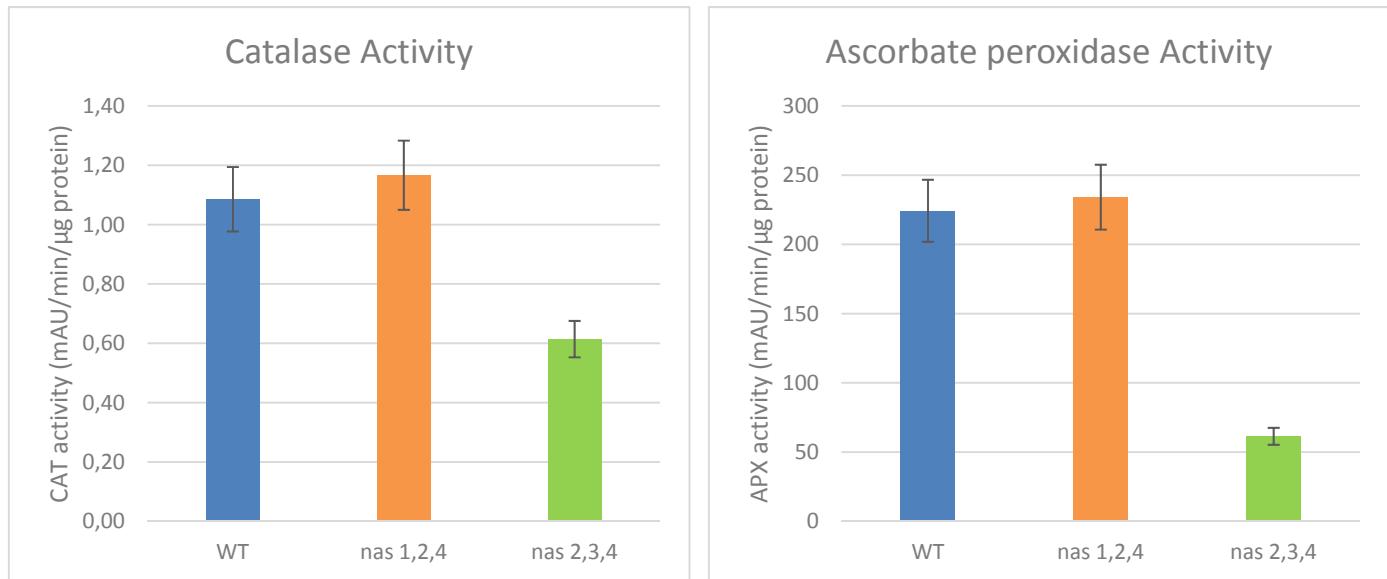


Figure S5 : Redox activity

A



B

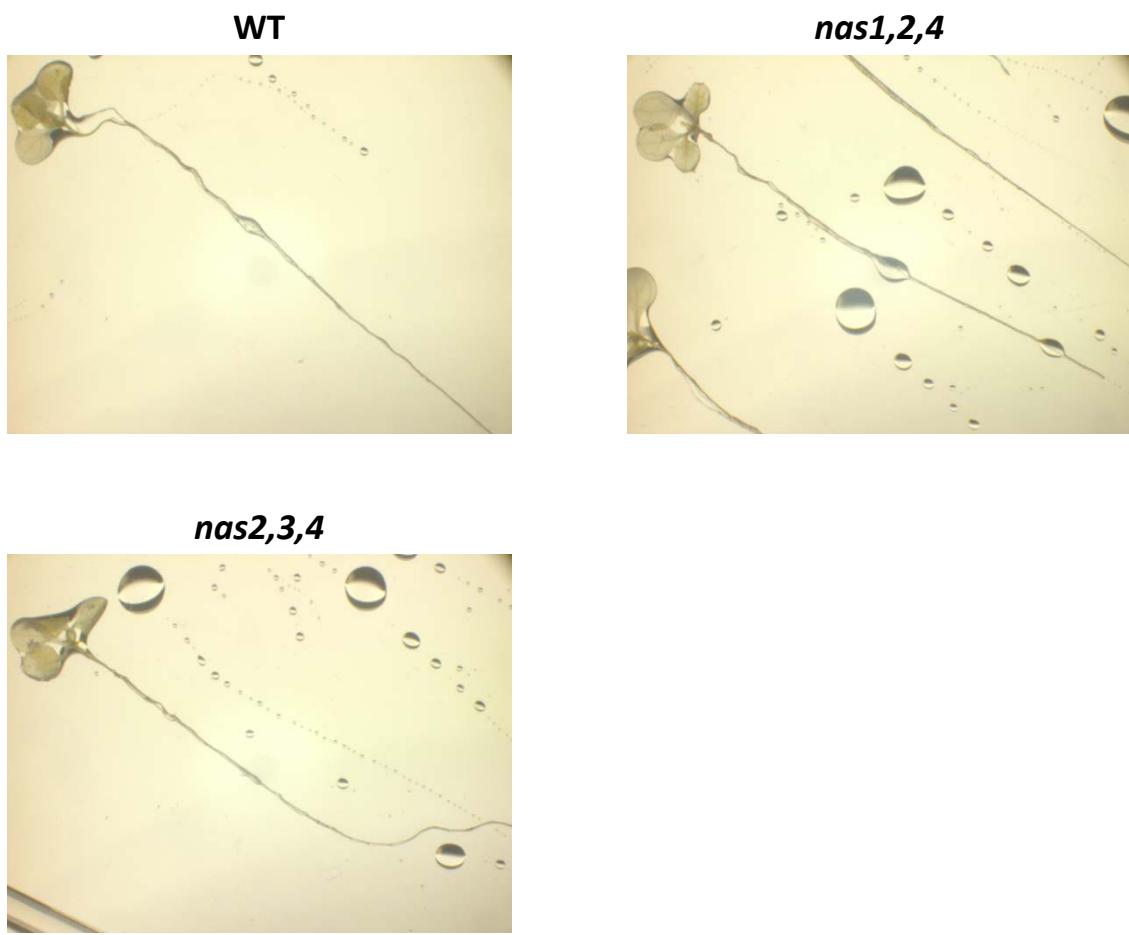


Figure S6 : Accumulation of 45S siRNA

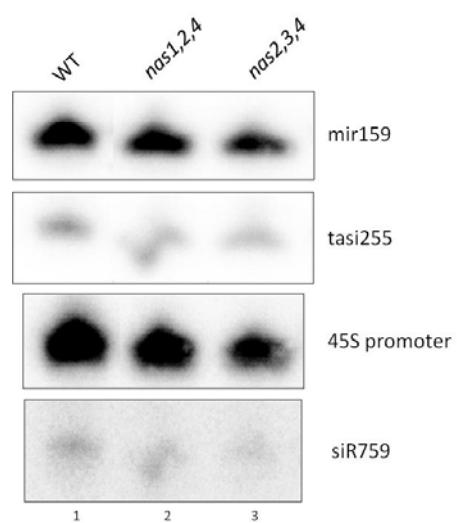
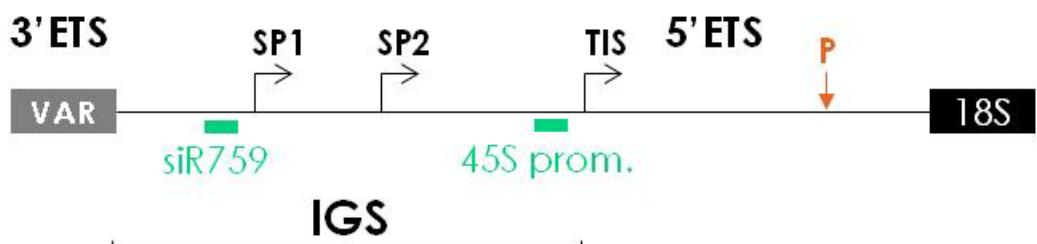


Figure S7 : Processing of rRNA precursors is not affected in *nas1,2,4*

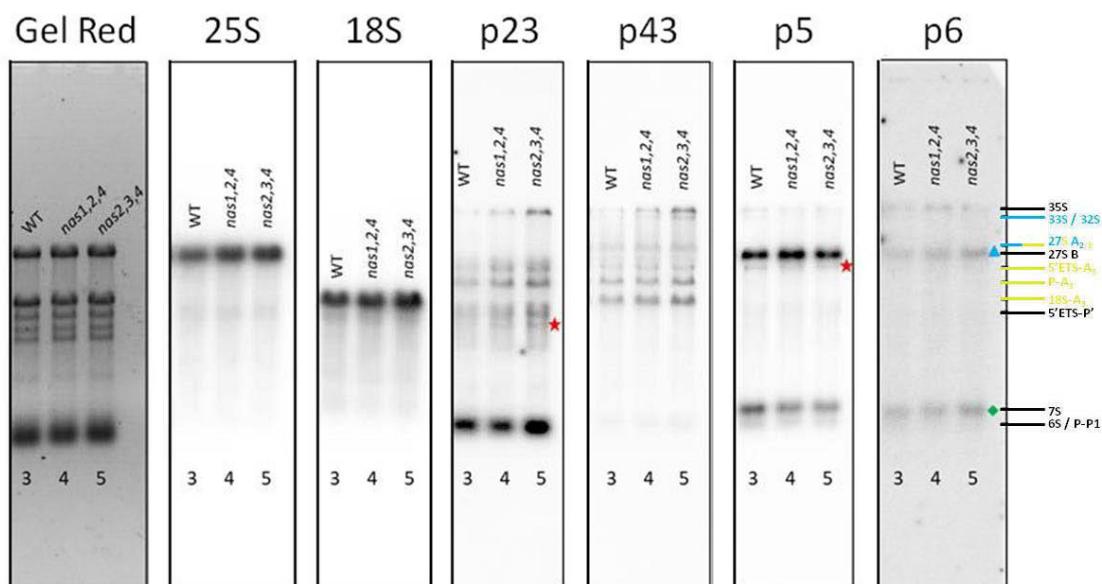
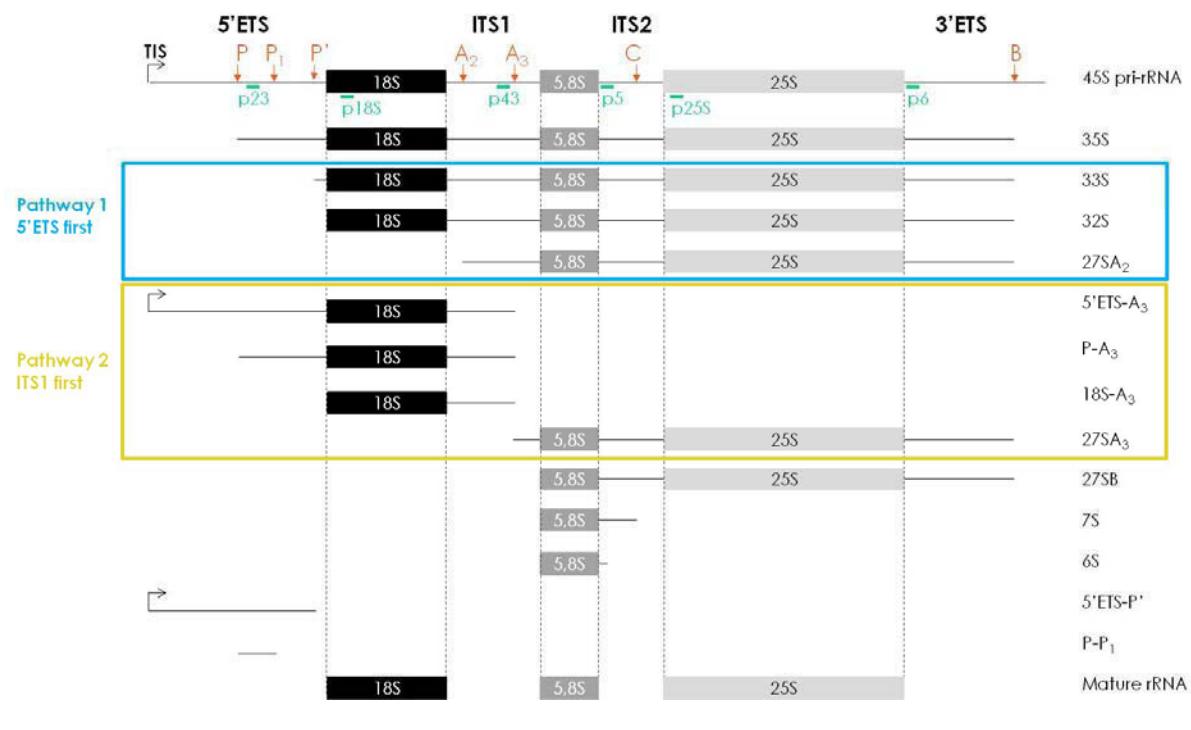


Figure S8 : Ribosome profiling is not impacted in *nas1,2,4*

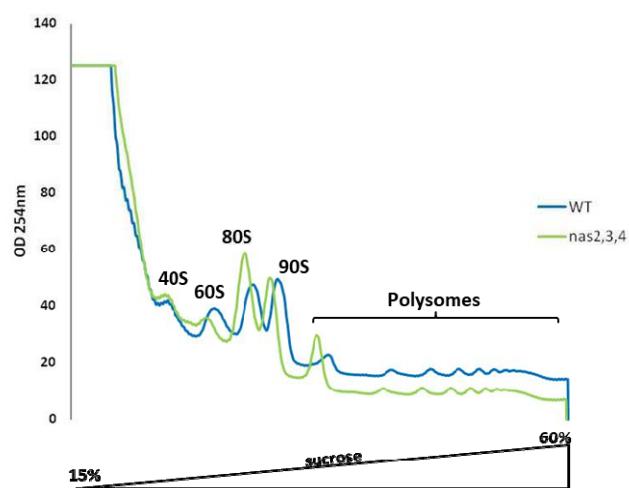
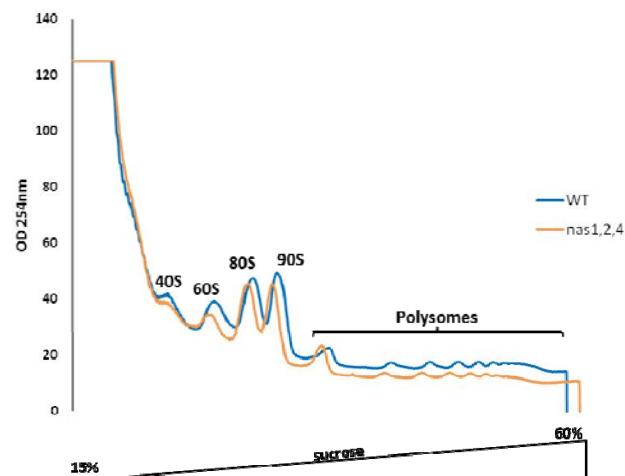


Figure S9 : Growth of *nas1,2,4* and *nas2,3,4* on antibiotic and sugar conditions

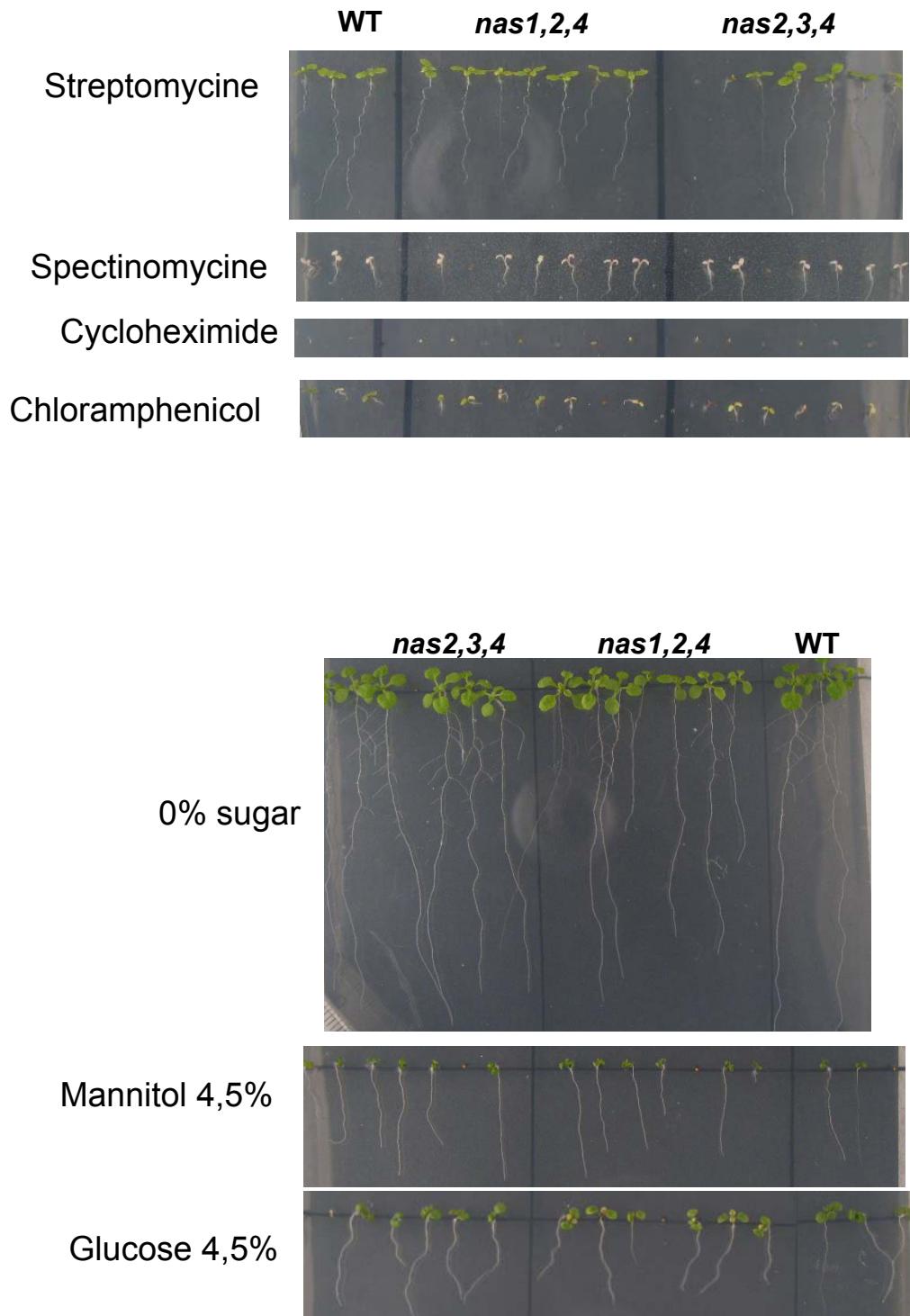


Figure S10 : rDNA functional organization is not affected in *nas2,3,4*

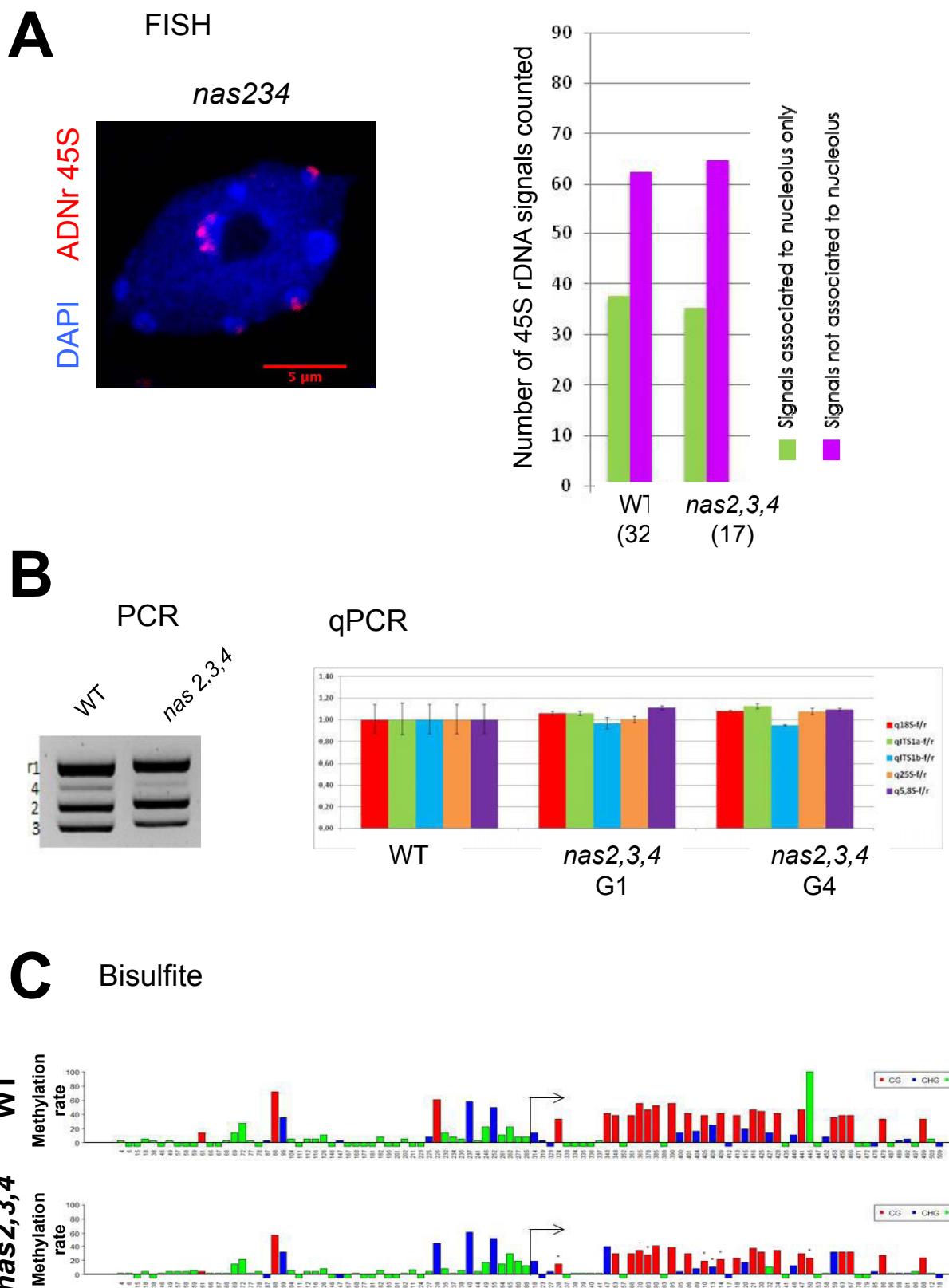


Table S1 : List of oligonucleotides

JSV nb	Name	Sequence	Target	Technic	
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGem-T plasmid	General probes	
	M13	GTAAAACGACGCCAGT			
	SP6	TATTTAGGTGACACTATAG			
JSV145	TIS +250	CAAGCAAGCCCATTCTCCTC	rDNA -220/+250	FISH	
JSV146	TIS -220	CAACTAGACCATGAAAATC	3'ETS variants	PCR / RT-PCR	
JSV108	108	GACAGACTTGCCAAAACGCCACC			
JSV109	109	CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT			
JSV112	112	GGATATGATGYAATGTTTGTGA	rDNA -315/+243	Takara PCR (Bisulfite)	
JSV113	113	CCCATTCTCCTCRACRATTACRC			
JSV124	124	TGGATAGTGAGAATAATAAGTGAAGAG			
JSV125	125	TCATCCATCATTTAACTAACTATTCT	3'ETS variants	RT-qPCR (ChIP)	
JSV172	172	TTTACACAGAAAATAGGATTAGTATCCTTATG	Downstream to TIS		
JSV173	173	CGGTGCCAACAAAAAGAAATACCTT	Downstream to P site		
JSV174	174	TTGGAACGATTGATGATTTGAGT			
JSV175	175	GCCTACGAACACTAGCTATCCGATC	25S		
JSV176	176	TGTTCACCCACCAATAGGGAA			
JSV177	177	TCAGTAGGGTAAACAACTACCTGTCTCAC			
JSV178	178	GAATTCCCAACTTACACGAGCTC	3'ETS upstream variants	RT-qPCR (copy number)	
JSV179	179	AAGTAATAACATTAAACCTCGAGAGACGAG			
JSV180	180	GTCAAACACTGGTGTATGAACACA			
JSV181	181	GCATGGGTTTGTATATTGAACGT	3'ETS downstream variants		
JSV137	137	CGCTCGCAAAGGGAT	3'ETS variants		
JSV138	138	ACCTCGTAGTGTAAACCC			
JSV987	Actin-f	GCCATCCAAGCTTCTCTC	Actin	Northern blot	
JSV988	Actin-r	CCCTCGTAGTGGCACAGT	Solo LTR		
JSV989	Solo LTR-f	TAGGGTTCTTAGGTGATCTGTATTGAGCTC			
JSV990	Solo LTR-r	TTGCTCTCAAACCTCAATTGAAGTTT	18S		
JSV1257	q18S-f	CGTAGTTGAACCTTGGGATG			
JSV1258	q18S-r	CACGACCCGGCCAATTA	ITS1		
JSV1259	qITS1b-f	TTCGCGTATCGGCATGA			
JSV1261	qITS1b-r	TTCGTTGCATGTTCTTGAC			
JSV1262	qITS1a-f	ATACCTGTCCAAAACAGAACG	ITS1	Primer extension	
JSV1263	qITS1a-r	CGATACCGAAACACAG			
JSV1264	q25S-f	GCATCAGGTCTCAAGGTG			
JSV1265	q25S-r	AGCCCTCAGGCCAAC	25S		
JSV1266	q5.8S-f	TAGCGAAATCGATACTTGG			
JSV1267	q5.8S-r	CGTTCAAAGACTCGATGGTT			
JSV152	p23	GTTCAACTAATCTACCGAAGTAC	Between P and P' cleavage sites	Northern blot	
JSV157	p43	CACTTTCGTCCGGGGTTTGTG	Between A ₂ and A ₃ cleavage sites		
JSV159	p5	GGATGGTGGGGACGACGATTGTG	Between 5,8S and C cleavage site		
JSV160	p6	CGTTAAGGAGCTTGCTTTAGTGTAG	Between 25S and 3'ETS variants		
JSV24	p25S	CCGATTTCAGCTGGCTTCCCGTTTC	25S		
JSV31	p18S	GTCCCTTCATAAGTCGGGTTTGTGCACG	18S	Primer extension	
JSV490	45S promoter	AATAGCCCTTCCCTTGGACCAACAGACATTG	siRNA from 45S promoter sequence		
JSV136	sir759	GAAGTCTCGGACCTGGTCGACAA	siRNA 759		
JSV7	tis	CCTCGTGCGATATCGATACCATCCC	TIS mapping		
JSV10	p	CCGATCACCCTCATACGCCAAC	P site mapping	U3 (control)	
JSV1015	U3	CTGTCAGACGCCGTGCGA	U3 (control)		

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Dans cette thèse, j'ai tenté d'approfondir la plurifonctionnalité et la malléabilité du nucléole en me focalisant d'une part sur ses fonctions extra-ribosomales, dans sa perception et sa réponse au stress thermique (chaleur), et d'autre part, sur l'influence de son organisation (structure/contenu) sur la biogénèse des ribosomes. Ces deux aspects sont discutés ci-dessous de manière générale.

Le protéome nucléolaire

L'analyse du protéome nucléolaire nous a permis de concrétiser deux objectifs :

L'identification de protéines dont l'implication dans la biogénèse des ribosomes n'a pas été établie.

L'étude des potentielles fonctions nucléolaires de ces protéines, qui peuvent être extra ribosomales ou non.

Ce protéome a été réalisé sur des nucréoles extraits de cellules organiques en tissus, contrairement aux autres protéomes nucléolaires de plantes réalisés sur des protoplastes (Palm et al., 2016; Pendle et al., 2005). Nous avons ainsi identifié les protéines nucléolaires dans un contexte physiologique tissulaire de la plante en croissance.

Si la quasi-totalité de ses acteurs RBF que nous attendions figuraient dans le nucléole, il semblerait que l'assemblage des protéines ribosomales, ou du ribosome, soit différent chez les plantes comparé à la levure.

Nous avons pu voir que la moitié des protéines ribosomales sont retrouvées dans le nucléole chez *A. thaliana*. Plus précisément, 24 protéines de la grande sous-unité sur 47 (Résultats – Partie 1 -1 article) et 17 de la petite sur 33. Il apparaît même que des protéines dites « tardives » dans leur accrochage et/ou leur implication dans la biogénèse des ribosomes sont retrouvées dans le nucléole. C'est le cas de ces protéines P1, RPL10 et RPL24 connues pour s'assembler à la pré-60S dans le cytoplasme chez la levure, mais retrouvées dans notre protéome nucléolaire et dans l'étude de Palm et al., 2016. En revanche, d'autres protéines ribosomales classifiées de « précoces » sont absentes du protéome nucléolaire (comme RPL8, RPL20, RPL33, RPS14, RPS27 et RPS27L).

Il est donc possible que les événements de maturation de la pré-60S se déroulent « plus tôt » chez *A. thaliana*, dans le noyau par exemple, et non dans le cytoplasme comme chez la levure (Palm et al., 2018). C'est comme si les événements étaient « décalés » plus vers l'intérieur du nucléole et de ce fait plaçant certaines étapes dans le noyau et plus dans le cytoplasme.

Par ailleurs, les PR sont très dynamiques, mobiles, et peuvent « suivre » l'avancée de la maturation des sous-unités sans s'y « accrocher » (Chen et al., 2017; O'Donohue et al., 2010). En effet, chez *A. thaliana*, la protéine p15.5 (Snu13) des complexes C/D snoRNP contient le motif commun aux protéines ribosomales L30/L7A/S12. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Snu13 contient également le motif RPL7A (Woolford and Baserga, 2013). De plus, RPS13 et

RPS18 ont été identifiées avec la NUC lors de la co-purification du complexe U3 snoRNP de *Brassica oleracea* (données non publiées, Sáez-Vásquez and Medina, 2008).

Mais les PR ne sont pas seulement impliquées dans la biogenèse des ribosomes, elles peuvent tenir d'autres rôles. C'est le cas de RPL11, RPL23 ou RPL5 qui interagissent avec MDM2 chez l'homme, pour activer p53 (Zhang and Lu, 2009; Zhou et al., 2015), ou encore RPL10 qui est lié à l'apparition de l'autisme, ou RPS15 impliquée dans la maladie de Parkinson (Zhou et al., 2015). Toujours chez les mammifères, certaines protéines ribosomales seraient impliquées dans la rétention de protéines riches en sérine et arginine (les SR protéines) au sein du nucréole. Ces SR protéines sont majoritairement impliquées dans l'épissage des ARNm (Lin et al., 2017). Il se pourrait donc, chez les plantes, que des PR soient impliquées dans des fonctions nucléolaires extra-ribosomales, qui seraient liées à leur accumulation dans le nucléole.

Au vu de ces observations et hypothèses, nous pouvons donc nous interroger sur l'impact de la présence / absence de ces PR dans le nucléole et sur la biogenèse des ribosomes. Y-a-t-il vraiment un décalage ou une maturation différente de ce qui est connu chez la levure ou les mammifères ?

Parallèlement à cela, nos études ne nous ont pas permis de révéler une différentiation dans la maturation des ARNr et du ribosome entre des plantes WT et mutantes. Plus précisément, il existe deux voies potentielles de maturation des ARNr chez *A. thaliana* : la voie où la coupure du 35S s'initie dans l'ITS1, voie principale; et la voie où la coupure du 35S débute dans la région 5'ETS, voie secondaire observée chez des mutants (Weis et al., 2015a). Nous n'avons pas mis en évidence de différence de maturation des ARNr, qualitativement (formes des pré-ARNr) ni quantitativement (accumulation des pré-ARNr). De plus, les formes de pré-ARNr observées appartiennent majoritairement à la voie principale ITS1 (Résultats Partie2 – Article en préparation Figure S7). Enfin, une étude sur la méthylation des ribosomes des ARNr a également été réalisée, mais aucune méthylation différentielle des ARNr matures WT et *nas1,2,4* n'a été observée. Pour terminer, l'analyse du profil des ribosomes par gradients de sucre n'a pas révélé de profils différents entre les plantes WT, *nas1,2,4* et *nuc1* (Résultats Partie2 – Article en préparation Figure S8).

Si l'on regarde les acteurs de la biogenèse du ribosome dans le nucléole d'*A. thaliana*, sur 132 facteurs de la biogenèse des ribosomes que nous avions listés (impliqués dans la maturation des sous-unités 40S et 60S), nous en avons retrouvé 93 (analyse du protéome nucléolaire – Article publié, Résultat - Partie 1-1). Parmi eux, nous avons identifié les protéines « core » des complexes snoRNP, à savoir la Fibrillarin (ou NOP1), NOP58, NOP56 et p15.5/SNU13 pour les C/D snoRNP responsables de la 2'-O-méthylation; et la Dyskerin, GAR, NHP2 et NOP10 pour les H/ACA snoRNP responsables de la pseudo-uridylation.

Nous avons également identifié les sous-complexes du processome 90S, dont UTP-B et MPP10 qui sont au complet et toutes les protéines composant l'U3snoRNP. Dans l'UTP-C ;

UTP22, CKA et RRP7 (impliquée dans la maturation du 18S, Figure 37, Annexe 1 Micol-Ponce et al., 2018) ont été trouvées, mais CKB est absente. Tandis que les UTP8, 9 et 10 sont manquantes à l'UTP-A. Cependant, UTP8 et UTP9 sont spécifiques à la levure, chez les plantes, on retrouve les protéines PCP1 et PCP2 qui interagissent avec l'UtpB, ces deux protéines sont retrouvées dans le protéome nucléolaire. Le fait de retrouver toutes ces protéines, constituant de 90S processome, confirme l'hypothèse de l'existence de ce complexe chez les plantes (Saez-Vasquez et al., 2004; Samaha et al., 2010).

Des protéines impliquées dans la maturation de la pré-60S ont également été identifiées. Parmi elles, on peut citer NOC2 (Fatica and Tollervey, 2002; Weis et al., 2015a), qui se charge du transport de la pré-60S du nucléole vers le nucléoplasme (avec NOC1) puis vers le cytoplasme avec NOC3, mais NOC1 n'a pas été retrouvée. Nous avons également identifié REX1, NOG1 et TIF6. Chez la levure, REX1 est essentiel pour le clivage dans l'ITS2 (Fernández-Pevida et al., 2015, Figure 37), tandis que NOG1 est impliqué dans le transport de la pré-60S du nucléole vers le noyau (Kallstrom et al., 2003). Enfin, TIF6, avec BRX1 (non identifiée), est impliquée dans la formation structurale de la pré-60S (Weis et al., 2015b). La protéine SMO4 (ou NOP53 chez la levure, Annexe 2 article en préparation en collaboration avec l'équipe de María Rosa Ponce), également impliquée dans la maturation de la pré-60S, a été identifiée.

Malgré cela, certaines enzymes impliquées dans la maturation précoce, co-transcriptionnelle, de l'ARNr n'ont pas été identifiées, comme RTL2 (premier clivage en B₀, Figure 37) et XRN2 (impliquée dans la dégradation de la partie 5' ETS, avant le clivage en P avec la participation de l'U3snRNP, Figure 37). En revanche, la protéine UTP24 a été identifiée dans notre protéome : chez la levure elle sert au clivage en A₁ (dans la partie 5'ETS du pré-ARNr), mais aucun rôle chez les plantes n'a encore été décrit (An et al., 2018; Bleichert et al., 2006). Il est possible que UTP24 chez les plantes soit aussi nécessaire au clivage en site P₂ (correspondant au site A₁ de la levure, Figure 37). Ces résultats confirment ceux trouvés dans l'étude de Palm et al., 2016.

Par ailleurs, il est possible que les protéines non détectées soient tout de même présentes dans le nucléole. Par exemple XRN2 a été trouvée dans notre exp-1, où 1 001 protéines ont été identifiées, contre 778 dans l'exp-2 (Résultats - Partie 1-1 – Article – Figure 1). L'activité d'une enzyme n'est pas nécessairement liée à sa quantité, au contraire il arrive que trop d'enzyme inhibe sa propre activité. Dans ce contexte, certaines enzymes / protéines ne sont présentes qu'en faible quantité. Il est donc possible que la profondeur de notre analyse de séquençage par LC-MS/MS n'ait pas été suffisante, ou qu'un nombre insuffisant de nucléoles aient été analysés.

La maturation des ARNr fait également intervenir des exonucléases ayant des fonctions extra-ribosomales (Henras et al., 2015; Weis et al., 2015a). Certaines de ces enzymes figurent dans notre protéome nucléolaire, comme MTR4, RRP6 et RRP46 (composantes du complexe TRAMP) et la quasi-totalité des protéines de l'exosome (sauf RRP45). TRAMP et l'exosome interviennent dans la dernière étape de maturation du pré-ARNr 7S (Figure 37), qui par

dégradation de son extrémité 3' devient le 5,8S mature (Lange et al., 2011, 2014; Sikorski et al., 2015). Par ailleurs, il a récemment été montré que chez la levure, TRAMP et l'exosome peuvent intervenir en cas de maturation « dégénérée » des ARNr, consistant en une coupure dans l'ITS1 (en A₃), au lieu de se poursuivre en 5'ETS (site A₀), en dégradant le produit « non conforme » (Choque et al., 2018). Ce rôle de l'exosome et TRAMP ainsi que les formes de précurseurs « dégénérés » n'ont pas été trouvés chez les plantes à ce jour mais cette possibilité n'est pas écartée.

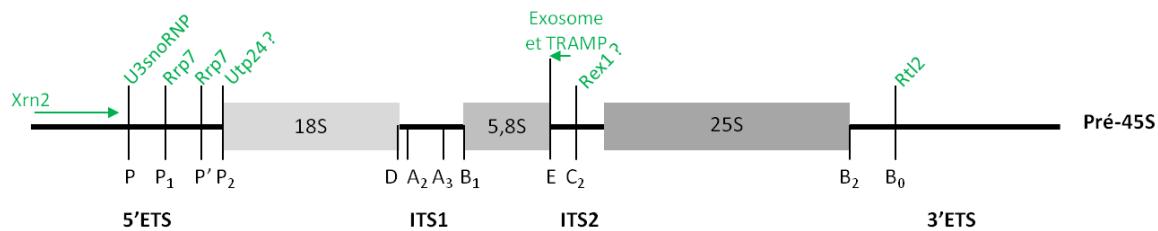


Figure 37 : Pré-ARNr 45S d'*A. thaliana* et les sites de maturation

Les sites de coupures observés lors de la maturation de pré-ARNr en ARNr matures sont indiqués en noir, sous le transcrit primaire. Les enzymes responsables, en partie, de ces coupures/ dégradation, sont indiquées en vert. Les enzymes associées à une flèche horizontale sont des exonucléases qui dégradent les extrémités libres de l'ARN. Les autres sont des endonucléases. Les enzymes dont nous connaissons le rôle chez la levure, mais pas chez les plantes, sont accompagnées d'un point d'interrogation.

D'autre part, nous avons également retrouvé des protéines composant le spliceosome ou impliquées dans la surveillance de la voie de biosynthèse des ARN messagers, avec notamment 4 protéines composant l'EJC (Exon-Junction Complex) dans notre protéome nucléolaire, tout comme dans les études de Palm et al. (2016) et Pendle et al. (2005).

Le spliceosome et l'EJC sont présents dans les corps de Cajal, qui peuvent être associés au nucléole et qui contiennent également la protéine Fibrillarine (Brown and Shaw, 2008; Leung and Lamond, 2003). Il est donc possible que lors du tri des nucléoles par FACS, des corps de Cajal, soit partiellement associé au nucléole, soit partiellement « fluorescence » conférée par la Fibrillarine couplée à la YFP, aient été purifiés avec les nucléoles.

Mais le spliceosome et l'EJC pourraient aussi intervenir dans la maturation des ARNr. En effet, ce sont aussi des ARN nécessitant une maturation par clivage, notamment les ITS qui pourraient être comparés aux introns. Une étude chez la levure a permis de démontrer que la protéine P RP43 (identifiée), de la sous-unité U2 du spliceosome, est impliquée dans la maturation des ARNr (Banerjee et al., 2015). De même, la protéine SNU13 fait également partie du complexe U4/U6, sous-unité du spliceosome (Woolford and Baserga, 2013).

Enfin, l'observation de ces complexes au sein du nucléole peut également être due à leur activité extra-ribosomale, puisque de nombreux ARN transitent dans le nucléole (Boisvert et al., 2007; Brown and Shaw, 2008; Pederson, 2011; Pederson and Politz, 2000).

En conclusion, le protéome nucléolaire d'*A. thaliana* nous a permis de référencer un grand nombre de protéines dont la fonction nucléolaire reste à définir. Ces protéines sont au sein du

nucléole pourraient être impliquées dans la biogénèse des ribosomes mais également dans d'autres fonctions extra-ribosomales, comme TRAMP, l'exosome ou le sliceosome. Il se peut également que des RBF soient impliqués dans des fonctions extra-ribosomales. Ce protéome ouvre donc de nombreuses perspectives pour l'étude des activités protéiques au sein du nucléole. Inversement, il est intéressant de voir que le seul impact d'une perturbation du nucléole (au niveau structural, contenu ou sur la biogénèse des ribosomes) sur les activités extra-ribosomales de protéines nucléolaires, comme nous l'avons fait pour le protéasome dans l'article Montacié et al., 2017.

Le protéasome dans le nucléole

Comme nous l'avons décrit dans l'article (Résultats – Partie 1-1 – Article – Figure S4), les nucléoles sont enrichis en protéines de la catégorie C OG O, relative aux protéines chaperonnes, ou impliquées dans le renouvellement et les modifications des protéines. C'est dans cette catégorie que l'on retrouve les sous-unités du 26S protéasome, particulièrement enrichies dans les nucléoles d'*A. thaliana*. Il est intéressant d'observer cette « cohabitation » entre la machinerie de production des protéines, les ribosomes en cours d'assemblage, et la machinerie de dégradation des protéines, le protéasome. Se pourrait-il qu'il y est une co-régulation ou une régulation « rétroactive » d'une machinerie sur l'autre ?

Dans nos analyses, les protéines composant les sous-unités du protéasome sont localisées dans la vacuole nucléolaire des WT (Résultats – Partie 1-1 – Article – Figure 1C ; et Figure 38A), comme c'est le cas pour le système ubiquitine-protéasome dans l'étude réalisée sur des cellules de soja (Stepiński, 2012). De plus, la formation de cette vacuole nucléolaire est visible en phase G1 et G2 de l'interphase lors du cycle cellulaire (Sáez-Vásquez and Medina, 2008), lorsque les nucléoles sont très actifs (d'un point de vue biogénèse des ribosomes). Le 26S protéasome est co-purifié avec le complexe U3snRNP-Nucléoline qui est impliqué dans la transcription et la maturation des ARNr (Sako et al., 2014; Samaha et al., 2010).

On peut donc supposer que la compartimentation spécifique du protéasome dans les vacuoles est peut-être liée à une fonction du protéasome, et/ou à la biogénèse du ribosome.

De plus, chez les mammifères et la levure, le 26S protéasome et/ou des sous-unités est/sont également retrouvé/es dans le nucléole (Stavreva et al., 2006). Des protéines RPT du protéasome s'associent au promoteur de l'ADNr. Les RPT interagissent également avec le facteur de transcription TIF-IA et apparaissent être nécessaires à la transcription de l'ADNr et d'autres facteurs de la biogénèse des ribosomes (Fátoly and Grummt, 2008; Stavreva et al., 2006).

D'un autre côté, une étude sur des cellules neuronales de rat, a permis de démontrer que la formation d'un centre fibrillaire géant (GFC) dans le nucléole, et de plusieurs petits FC, induit l'accumulation du facteur de transcription UBF dans ce GFC. En revanche, le protéasome en

est exc lu (Casafont et al., 2007). Le GF C é tant plus a ctif à la transcription des A DNr, comment le protéasome peut-il promouvoir leur transcription s'il n'est exclu ? A giraient-il comme un anti-répresseur de la transcription des ADNr ? Se pourrait-il que le protéasome soit nécessaire à la transcription des ADNr, mais de manière spécifique, par exemple lors de stress ou encore dans des tissus spécifiques ? Le protéasome et UBF seraient alors des activateurs complémentaires qui pourraient se lier sur des copies spécifiques de ces ADNr (variants ou répétitions dans les IGS par exemple) pour induire leur expression préférentielle.

Chez les plantes, aucun FC géant n'a été observé. Le facteur UBF/Hmo1 (mammifère/levure) est absent, mais il existe des protéines contenant des boîtes HMG (tout comme UBF et Hmo1).

Chez les animaux en cas d'inhibition du protéasome, ce dernier est relocalisé dans le nucléole sous la forme de gros agrégats (Arabi et al., 2003; Mattsson et al., 2000). L'inhibition du protéasome induit également une déstructuration nucléolaire accompagnée d'une accumulation du 90S SSU processome, d'un ralentissement de la production des ribosomes, mais également d'un accroissement de la taille du nucléole dans les ovocytes de porc (Jitsukawa et al., 2012; Stavreva et al., 2006).

Chez *A. thaliana*, nous avons remarqué une déstructuration du nucléole (par observation d'une relocalisation de FIB2) en cas d'inhibition du protéasome. De manière similaire, la déstructuration du nucléole dans le mutant *nuc1* est liée à l'agrégation du protéasome sous forme de « points » à l'intérieur du nucléole et à une diminution de l'activité protéasomale (Résultats – Partie 1-1 – Article – Figures 2, 3, 4 et S4 ; et Figure 38A).

De plus, la mutation de NUC1 induit l'accumulation générale des pré-ARNr en cours de maturation, dont les pré-ARNr clivés au site P (forme 35S), comparés aux transcrits pré-ARNr naissants. Mais lorsque l'on inhibe le protéasome dans *nuc1*, on « ré-augmente » la maturation, moins d'ARNr clivés au site P (Résultats - Partie 1-1 – Article - Figure 5). La mutation de NUC1 induit également l'expression du VAR1 et une hypométhylation des riboses des ARNr, sans affecter l'assemblage des complexes C/D snoRNP (données non décrites dans le manuscrit en vue d'une publication future).

NUC1 pourrait alors participer à l'acheminement des RBF jusqu'aux ARNr en maturation, les protégeant de la dégradation (Figure 38B). Dans le mutant *nuc1*, les RBF libres, non complexés, s'approchant des ARNr seraient rapidement dégradés par le protéasome. Et chez *nuc1* en cas d'inhibition du protéasome, les RBF auraient un « accès libre » aux ARNr, créant plus d'événements de maturation.

Une autre possibilité est qu'il y ait tout simplement plus d'événements de transcription chez le mutant *nuc1*, provoquant l'accumulation de transcrits (Figure 38B). Le protéasome 26S serait alors un activateur de la transcription, et NUC1 un régulateur de la transcription qui réprimerait l'activité « ribosomale » du protéasome.

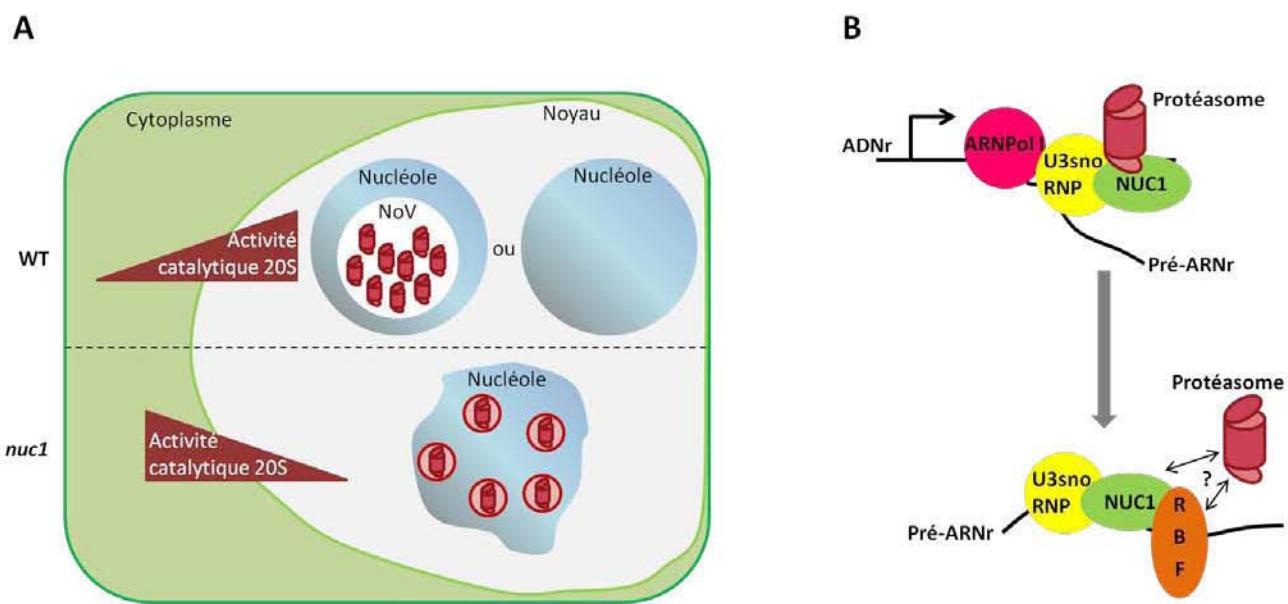


Figure 38 : Modèles de la régulation nucléolaire du protéasome et de son rôle dans la transcription et/ou la maturation des ARNr

A : Dans les nucléoles des plantes WT, le protéasome 26S est localisé dans la vacuole nucléolaire (NoV). De plus, l’activité 20S du protéasome est plus élevée dans le noyau que dans le cytoplasme. À l’inverse, dans le mutant *nuc1*, l’activité du protéasome est plus forte dans le cytoplasme que dans le noyau. Et au sein du nucléole déstructuré de *nuc1*, le protéasome forme de petits agrégats (cercles rouges).

B : Le protéasome, ou certaines de ses sous-unités, favoriserait la transcription des ADNr comme chez les animaux, mais NUC1 pourrait réguler négativement cette activité pour maintenir un certain niveau de transcrits. Par la suite, le complexe U3snoRNP-Nucléoline se lie aux pré-ARNr, NUC1 recruterait les RBF pour la maturation des ARNr. Si les RBF étaient trop nombreux, ou non associés à la NUC1, ils seraient dégradés par le protéasome 26S.

Qu’en serait-il de la méthylation des riboses des ARNr en cas d’inhibition du protéasome, chez le WT et *nuc1*? Est-ce que le VAR1 est exprimé en cas d’inhibition du protéasome, chez le WT et *nuc1*?

L’activité catalytique n’est pas affectée chez *rpt5a* et *rpt2a* (partie 19S régulatrice – voir Résultats – Partie 1-1 Article publié Figure 3, Sakamoto et al., 2011), mais elle le sera sûrement dans un mutant de la sous-unité catalytique 20S. On peut donc également se demander si la maturation (par clivage et modifications chimiques) des ARNr serait altérée chez des mutants du protéasome.

Par contre, l’activité protéasomale chez le WT est plus forte dans le noyau que chez le mutant *nuc1*. Si l’on regarde dans le cytoplasme, l’activité protéasomale du WT est plus faible que chez *nuc1* (Figure 38A). Il est alors possible que le protéasome soit partiellement inhibé dans le cytoplasme chez WT, et que chez le mutant *nuc1*, l’effacteur responsable de cette inhibition soit relocalisé dans le nucléole, à cause de sa déstructuration. Encore, il est possible que le protéasome transite dans le nucléole pour subir de modifications post-traductionnelles, chimiques et/ou structurales, influant sur son activité (Kurepa and Smalle, 2008; Kurepa et al., 2009). Inversement, la déstructuration du nucléole chez *nuc1* est peut-être la cause directe de la baisse d’activité du protéasome observée dans le noyau : par sa

relocalisation il ne peut pas interagir avec ses « partenaires » et donc son activité est affectée. L'absence de NUC1 le-même pourrait être responsable de cette baisse d'activité chez le mutant dans le nucléole, puisque NUC1 et le protéasome interagissent et pourraient donc avoir des fonctions liées.

Cependant le rôle principal du protéasome est la dégradation des protéines, ubiquitinées pour être reconnues spécifiquement et des études ont démontré la dégradation des protéines ribosomales par le protéasome 26S (Sung et al., 2016a, 2016b). Il est donc possible qu'il soit présent au sein du nucléole pour permettre la dégradation de protéines trop accumulées ou inutiles.

En conclusion, si le protéasome est accumulé dans la vacuole nucléolaire chez les plantes, son rôle exact reste encore à définir. D'après nos résultats, nous pouvons supposer que NUC1 et le protéasome 26S agissent, de manière directe ou indirecte, pour réguler la transcription et/ou la maturation des ARNr. Cependant, il est possible que le protéasome nécessite un passage par le nucléole pour être totalement fonctionnel. Enfin, nous ne pouvons négliger le fait que le protéasome puisse jouer son rôle de dégradation des protéines au sein du nucléole. Il serait alors intéressant d'analyser l'activité du protéasome dans les nucléoles. Nous pourrions également étudier l'impact du stress sur l'activité du protéasome dans les différents compartiments cellulaires.

Le nucléole face au stress

Le protéome du nucléole à 37°C a été réalisé dans l'intention d'identifier des protéines, impliquées dans des fonctions diverses, potentiellement régulées par le nucléole en cas de stress thermique chaud. Cependant, à l'heure actuelle une seule expérience a été réalisée et il conviendra donc d'effectuer un second protéome nucléolaire à 37°C pour confirmer celui-ci. J'ai cependant tenu à analyser les résultats préliminaires.

Nous avons pu constater que 3189 protéines ont été identifiées à 37°C, soit 5 fois plus qu'à 22°C pour un nombre équivalent de nucléoles. Nous avons pu voir que les nucléoles à 37°C sont plus « granuleux » que ceux à 22°C. Il est donc possible que cet aspect soit dû à un nombre plus important de protéines dans le nucléole lors d'un stress thermique qu'en conditions normales (Résultats - Partie 1-2 – Figure 32).

D'ailleurs, chez les animaux, il a été démontré que des protéines peuvent être séquestrées dans le nucléole en cas de stress environnementaux, tels que la chaleur par exemple. De plus, cette rétention de protéines induit une modification de la structure du nucléole avec la formation d'un centre de détention et la relocalisation des structures FFC, DFC et GCF en périphérie du nucléole (Audas et al., 2012a, 2012b; Jacob et al., 2013).

Nous avons également observé une modification structurelle des nucléoles soumis à la chaleur chez *A. thaliana*, avec une redistribution de la Fibrillarine car la fluorescence est homogène dans le nucléole (Résultats - Partie 1-2 – Figure 31). La FIB2 ne se « regroupe pas » pour

définir le composé fibrillaire dense (DFC). Même si cette nouvelle répartition des composés nucléolaires semble différente chez les mammifères et chez les plantes, on ne peut exclure que ce remaniement induise de modifications fonctionnelles, comme la rétention de protéines chez *A. thaliana* par exemple. Pour plus de précision sur la structure interne des nucléoles, leur observation en microscopie électronique pourrait être envisagée. D'ailleurs, la biogénèse des ribosomes est-elle affectée en cas de stress thermique chaud ? Nous n'avons pas réalisé d'étude sur la méthylation de l'ARNr dans ce contexte, mais la distribution de la FIB2 observée en conditions de stress thermique est semblable à celle observée chez le mutant *nuc1*, ou lorsque l'on inhibe l'activité protéasomale (Montacié et al., 2017). De plus, des études dans le laboratoire sur des plantes WT ont permis de montrer que les précurseurs d'ARNr s'accumulent de façon significative à 37°C, comme chez *nuc1*. Mais seuls les VAR2 et VAR3 s'expriment à 37°C chez le WT, comme à 22°C. Il ne semble donc pas y avoir de modification des copies transcrtes par l'ARNPol I. Il est possible qu'à 37°C la biogénèse des ribosomes soit mise « en pause » ou ralentie, provoquant l'accumulation des précurseurs d'ARNr.

Tous les composants de la partie régulatrice 19S du protéasome ont été identifiés dans le protéome des nucléoles à 37°C, ainsi que tous les éléments de la partie catalytique 20S, sauf PAB1 (α2). De plus, nous avons noté que la sous-unité RPT5b présente à 22°C est remplacée par l'isoforme RPT5a à 37°C. Se pourrait-il que ce changement de la composition du protéasome soit lié à une activité spécifique en cas de stress chaud ? Pour la dégradation des autres protéines retenues dans le nucléole ? Pour agir sur la biogénèse des ribosomes ? Et quel est l'impact de la chaleur sur l'activité du protéasome ? Ou si l'on inhibe le protéasome à 37°C (avec du MG132 par exemple), y a-t-il un retour à une maturation « normale » ?

Par ailleurs, en cas de stress thermique à 37°C, quatre RPL (RPL 19, 28, 38 et 39) supplémentaires ainsi que RPS28 sont identifiées dans le nucléole. Il se peut que la maturation des sous-unités ribosomales soit modifiée en cas de stress et cela peut faire intervenir des PR différentes de celles nécessaires en conditions standards.

A l'inverse, la protéine S27a présente à 22°C n'est pas retrouvée pendant le stress thermique. Et il se trouve que cette protéine peut être ubiquitinée, ce qui influe sur son niveau d'expression. Chez le tabac par exemple, si on lui retire son extension ubiquitine, S27a est réprimée. De plus, l'inhibition de S27a induit un nannisme des plantes, celles-ci présentant moins de ramifications (Hanania et al., 2009).

Les protéines « séquestrées » dans le nucléole des mammifères en cas de stress présentent des motifs spécifiques qui sont appelés Nucleolar Domains (NODS) pour leur signal. Ces motifs, constitués de deux motifs hydrophobes (L-X-L/V) et d'un motif arginine (R-R-L/I), interagissent avec un long ARN non-codant issu des séquences intergéniques des ADNr (Audas et al., 2012a). Parmi les protéines présentes à 37°C et absentes à 22°C, certaines comme LAS1 ou RRP44A, une endonucléase et une exonucléase respectivement, contiennent ces motifs et sont impliquées dans la maturation des ARNr au niveau de la 60S. Mais il arrive aussi que des protéines présentes uniquement dans le nucléole à 22°C possèdent ce type de motif. C'est le cas de RRP5 par exemple.

Enfin, dans le cas des sous-unités du protéasome, les sous-unités RPT5a et RPT5b, présentes à 37°C ou 22°C respectivement, possèdent également ce motif.

Parallèlement à cela, nous avons observé la production des ARN non-codants issus des IGS chez des plantes WT en conditions standard de croissance (Earley et al., 2010), et nous avons pu voir qu'ils s'accumulent en cas de stress thermique à 37°C (données non montrées).

D'après ces expériences et les données chez les mammifères, nous pouvons supposer que ce mécanisme de régulation de l'aller et venue des protéines au sein du nucléole peut être en partie régulé via ces ARN non-codants. Il est possible qu'un ARN spécifique à chaque situation soit transcripté pour sélectionner les protéines avec lesquelles il interagit, soit en modifiant certains résidus de motifs, soit par d'autres enchaînements d'acides aminés non découverts. Certaines protéines « retenues » pourraient aussi l'être via l'action d'autres protéines, comme chez les animaux où la protéine ribosomale pNO40 permet la séquestration nucléolaire de protéines riches en sérine et arginine (Lin et al., 2017).

Le stress thermique chaud induit aussi une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules, pouvant provoquer une mort cellulaire programmée impliquant le fer (Distefano et al., 2017). Des protéines impliquées dans le maintien de l'état redox de la cellule (thioredoxines et glutaredoxines), COG O également, ont été retrouvées dans le nucléole à 22° et 37°C. Plus précisément, ce sont les protéines qui sont impliquées dans la gestion de l'oxydoréduction qui sont les plus représentées après le protéasome. Ces protéines, telles que les glutarédoxines (GRX), peroxirédoxines (PRX) et thiorédoxines (TRX), servent à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O ou d'acides avec groupements fonctionnels soufre (les acides sulfoniques SO_3H , sulfiniques SO_2H et sulféniques SOH , oxyde nitrique $-NO$ et S-glutathionylation $S-SG$) en formes réduites SH (Martins et al., 2018).

Leur rôle au sein du nucléole n'a pas encore été étudié, mais une étude chez le tabac a montré l'accumulation d' H_2O_2 dans le nucléole en présence de Ca^{2+} (Ashtamker et al., 2007). Le fer s'accumule également dans le nucléole, pouvant créer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par des réactions de Fenton (Roschzttardtz et al., 2011 et Résultats - Partie 2 - Article en préparation - Figure 2C). Il se pourrait alors que le nucléole serve à la détoxicification de la cellule en accumulant le peroxyde d'hydrogène engendré par un stress, ainsi que le fer en excès, et procéder à la réduction des ROS en formes « inoffensives ». Cela pourrait expliquer la présence importante de fer dans le nucléole.

En effet, la quantité de fer marqué au Perls/DAB paraît bien trop importante pour correspondre uniquement à du fer « enzymatique » (cluster fer-soufre / héme), et aucune Ferritin n'a été identifiée dans notre protéome nucléolaire. Le fer serait donc stocké dans le nucléole, par un processus encore inconnu. Les protéines GRX, PRX ou TRX, seraient présentes pour éviter la production de ROS, même si nous n'avons pas observé de différence dans les activités Catalase et Ascorbate peroxidase entre les plantes WT et les mutants *nas1,2,4* (Résultats – Partie 2 - Article en préparation - Figure S5). Le fer pourrait être nécessaire à d'autres processus encore inconnus dans le nucléole. Par exemple, il pourrait être

stocké dans le nucréole pour être facilement fourni au nucréole pour des activités enzymatiques du noyau, en plus de celles étant dans le nucléole.

Parmi les nouvelles voies à explorer, on peut penser à la biogénèse des ribosomes contenant au moins deux protéines à cœur fer-soufre, RLI1 (ABCE1) et la sous-unité AC40 (NRPA3) de l'ARNPol I (Balk and Pilon, 2011). Il se peut également que le fer soit nécessaire à d'autres voies se déroulant dans le nucléole ou étant dans des protéines à cœur fer-soufre qui régulent d'autres facteurs présents et actifs dans le nucréole. Par exemple le protéasome est-il régulé par l'oxydo-réduction ? Quelles protéines nucléolaires sont régulées par leur état oxydatif ?

Nous savons que chez les mammifères, le stress oxydatif induit la dissociation des sous-unités du 26S protéasome, en 20S et 19S intactes et fonctionnelles, et inversement, une inhibition du protéasome induit une augmentation de ROS dans la cellule. De plus, la partie 20S est recrutée pour dégrader les protéines oxydées dont la conformation 3D est altérée. Enfin, les protéines constituant le protéasome peuvent être modifiées par le stress oxydatif : glutathionylation, carbonylation, lipidoxidation et glycoxidation influant ainsi sur l'assemblage et/ou l'activité du 26S protéasome (Lefaki et al., 2017).

Chez *A. thaliana*, un lien entre un stress biotique et la voie du fer a été démontré. En effet, lors d'une infection virale, la protéine AlMV CP (issue de Alfalfa mosaic virus) est contenue dans le nucléole afin d'éviter le développement et la multiplication du virus dans la plante. De plus, cette protéine virale interagit avec le facteur de transcription ILR3, impliqué dans la régulation de l'homéostasie du fer (Kalinina et al., 2018). Il se peut que cette interaction ait lieu dans le nucréole ou à l'inverse que la protéine virale soit « bloquée » dans le nucréole pour éviter d'entrer en contact avec d'autres éléments de la cellule hôte parasitée.

Afin de valider nos observations, il conviendra de refaire un protéome nucléolaire à 37°C. À partir de là nous pourrons, premièrement, vérifier l'existence de NodDS sur les protéines « séquestrées » à 37°C ou identifier d'autres mécanismes de rétention. Deuxièmement, déterminer le(s) rôle(s) de ces protéines au sein du nucléole et voir si les activités de ces protéines nucléolaires présentes en conditions standard et de stress changent à 22 et 37°C.

On peut également se demander si les nucléoles à 37°C contiennent plus ou moins de fer qu'à 22°C ? Les deux réponses paraissent plausibles. D'un côté, il se peut qu'il y ait moins de fer dans les nucléoles à 37°C car ils semblent déstructurés. Le fer pourrait donc s'en « échapper ». Pour la même raison, le fer peut aussi venir s'accumuler dans le nucléole puisque celui-ci est déstructuré et peut-être moins dense, permettant le passage des ions fer. Ces deux hypothèses sont supportées par le fait qu'à 37°C, les protéines Ferritines 3 et 4 sont retrouvées dans les nucléoles alors qu'elles n'y sont pas à 22°C. Dans le cas où le fer est moins présent dans le nucléole, les Ferritines pourraient servir à tout de même maintenir du fer dans le nucréole. Afin que le fer soit disponible rapidement pour des activités enzymatiques, tout comme les Ferritines le font dans d'autres organelles. Si c'est dû à l'accumulation du fer, c'est peut-être que les Ferritines viennent en « renfort » des autres mécanismes qui « emprisonnent » le fer dans le nucléole pour éviter la production de ROS.

Le fer nucléolaire et son impact sur la biogenèse des ribosomes par l'étude du mutant *nas1,2,4*

Nous avons remarqué que la régulation de la transcription des ADNr peut également être liée à l'absence de fer nucléolaire, et cellulaire, chez le mutant *nas1,2,4* (Résultats – Partie 2 – Article en préparation - Figures 1 et 2). En effet chez ce mutant, on observe l'expression des ADNr situés sur le NOR2 (ADNr VAR1), normalement inactif (Abou-Ellail et al., 2011; Chandrasekhara et al., 2016; Mohannath et al., 2016; Ponthvianne et al., 2010). Cette expression du NOR2 est également observée chez d'autres mutants comme *nuc1*, *nuc2* ou *fas2* (Durut et al., 2014). Chez les mutants *fas2* et *nuc2*, l'expression du NOR2 est accompagnée d'une modification dans le ratio des variants, non observé chez le mutant *nuc1*. De manière intéressante, nous avons observé une distribution altérée du fer chez *nuc1*. En effet, il y a beaucoup moins de nucléoles marqués par le Perls/DAB, et donc beaucoup ne contenant pas de fer (données non montrées).

De plus, les nucléoles des mutants *nas1,2,4* à 10 et 15 jours présentent plus de centres fibrillaires (FC) que ceux des WT au même âge (Résultats – Partie 2 – Article en préparation - Figure 3). Sachant qu'à 5 jours le nombre de FC est identique chez les plantes mutantes et WT, cela signifie qu'il y a plus de copies/unités d'ADNr actives dans les nucléoles des plantes mutantes (Raška et al., 2006; Sáez-Vásquez and Medina, 2008; Stępiński, 2014). Ces données suggèrent qu'en fait le NOR2 reste associé au nucléole et n'est donc pas réprimé chez le mutant *nas1,2,4* (Figure 39).

Chez les plantes WT, les séquences VAR1 sont exprimées jusqu'à 4j puis réprimées à 8j. C'est-à-dire qu'au stade précoce du développement, le NOR2 est actif, puis est réprimé à 8j (Durut et al., 2014). Lors des premiers jours de croissance, les plantes utilisent le fer contenu dans la graine, puis commencent à « refaire » le plein de fer vers 6-8 jours (Schmidke and Stephan, 1995; Schmidke et al., 1999). On peut donc imaginer que l'arrivée du fer, et donc sa répartition dans la plante et les cellules jusqu'au nucléole, est corrélée avec la répression du NOR2 (Figure 39). Cette hypothèse reste à vérifier.

Des tests au laboratoire sont en cours sur des plantes WT et *nas1,2,4* poussées *in vitro*, dans un milieu contenant ou non du fer. Les plantes seront récoltées à 2, 4, 8, 10 et 15 jours après-germination pour vérifier la non-répression du NOR2, et donc l'expression du VAR1, en absence de fer.

De plus, nous voudrions introduire des Ferritines dans le nucléole, en les couplant à la FIB2, pour permettre un adressage au nucléole. Les Ferritines pourront alors « emprisonner » le fer, qui était « potentiellement » disponible dans le nucléole.

Cependant, bien qu'il y ait plus de copies ADNr actives, il semblerait qu'il n'y ait pas plus de transcrits d'ADNr chez *nas1,2,4* que chez le WT, et que le profil d'assemblage des sous-unités ne soit pas différent (Résultats – Partie 2 – Article en préparation - Figures S7 et S8). Nous avons alors voulu savoir quels peuvent être les mécanismes régulant la répression du NOR2 et qui sont liés au fer.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux marques épigénétiques, et nous avons remarqué que les promoteurs des ADNr sont hyperméthylés chez le mutant *nas1,2,4*, particulièrement en contexte CHG et CHH (Résultats – Partie 2 – Article en préparation - Figure 5). Cela paraît contradictoire avec le fait que la méthylation des promoteurs induit une répression de l'expression. Il se pourrait que chez le mutant *nas1,2,4* cette hyperméthylation soit observée à cause de la répression du VAR3 (Résultats – Partie 2 – Article en préparation - Figures 1 et S1). Cette hausse de méthylation pourrait être expliquée par un dysfonctionnement de ROS1 (ou DME, protéine de type DEMETER). ROS1 est une protéine à cœur fer-soufre impliquée dans la déméthylation de l'ADN, particulièrement en contexte CHH (Balk and Pilon, 2011; Tang et al., 2016). De plus l'action de MET18, une autre protéine à cœur fer-soufre, est nécessaire pour une pleine activité de déméthylation de ROS1 (Wang et al., 2016). Donc si l'activité de ces deux enzymes est affectée par le manque de fer, il se peut que certaines copies restent méthylées chez *nas1,2,4* alors qu'elles sont démethylées chez le WT. Nous envisageons d'observer l'expression du NOR2, et des variants de manière générale, dans les plantes mutantes pour ROS1 et MET18 afin de vérifier leur implication dans l'expression des ADNr.

Pourtant ces protéines sont nucléoplasmiques et ne sont pas présentes dans le nucléole. Donc le fer nucléolaire influerait, servirait de stock, peut-être sur les activités nucléaires nécessitant du fer. Et pour l'expression du NOR2, on peut imaginer que d'autres remodelateurs de la chromatine, à cœur fer-soufre ou régulés par des protéines à cluster fer-soufre, soient des inhibiteurs de la transcription. Ces inhibiteurs pouvant avoir une activité altérée en absence de fer, les copies ADNr du NOR2 pourraient rester actives au lieu d'être réprimées. Peut-être via NUC1, car dans le mutant *nuc1* le VAR1 est exprimé et les nucléoles sont « pauvres » en fer ? Ou encore HDA6 ? Et dans ce cas, quels seraient les régulateurs de cette voie ? Des protéines à cœur fer-soufre ?

Par ailleurs, on peut se poser la question de l'activité de l'ARNPol I au sein des Centres Fibrillaires (Figure 39). En effet, s'il n'y a pas plus de transcription dans le mutant *nas1,2,4*, c'est que l'ARNPol I doit « moins » s'associer aux ADNr ou qu'elle est moins active. Remarquablement, la sous-unité AC40 (NRPA3) de l'ARNPol I contient un cœur fer-soufre (Balk and Pilon, 2011; Fernández-Tornero et al., 2013; Ream et al., 2015). Elle pourrait donc être moins active par manque de fer dans le nucléole, nécessaire pour le cluster fer-soufre de AC40 par exemple. De ce fait le nucléole, « sachant » que l'ARNPol I est moins active, « décide » de fournir plus de copies d'ADNr à transcrire (celles du NOR2) afin de pallier le manque d'activité transcriptionnelle de l'ARNPol I (Figure 39).

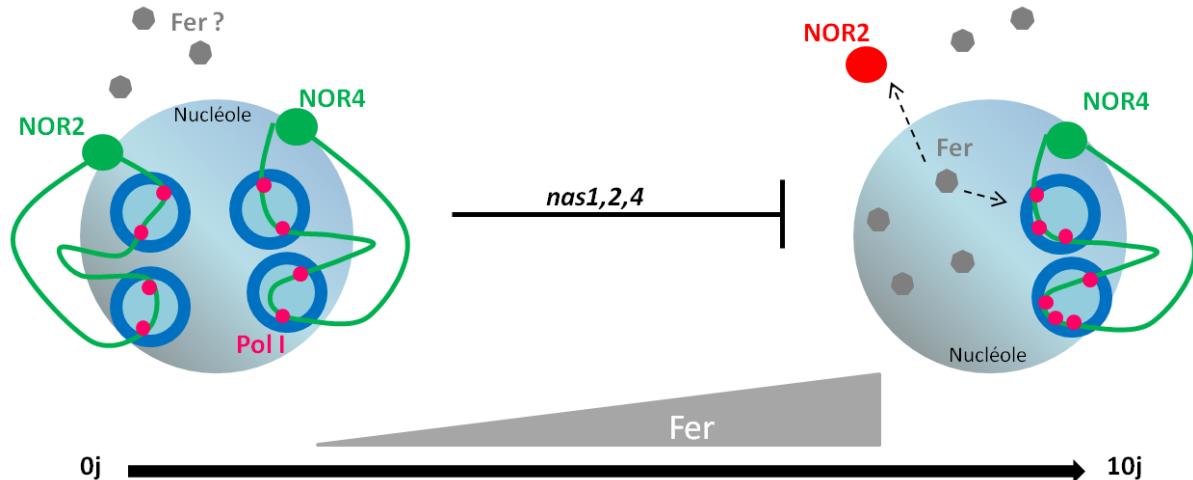


Figure 39 : Modèle proposant une corrélation entre la répression du NOR2 et l'accumulation de fer dans le nucléole
 Entre 0 et 4 jours, les copies présentent sur les deux NOR sont transcrtes (verts) dans les FC/DFC (bleu clair/foncé) du nucléole par l'ARNPol I (petite boules roses). À 10 jours, le fer s'est accumulé dans le nucléole et a induit une répression du NOR2 (rouge), mais a permis « d'améliorer » l'activité transcriptionnelle de l'ARNPol I ou qu'il y ait plus d'ARNPol I associées aux ADNr pour les transcrire. Cette transition n'est pas réalisée dans le mutant *nas1,2,4*.

Les ARNPs peuvent également être modifiés chimiquement par l'oxydation, la pseudouridylation ou encore la méthylation des riboses et des bases (Honda et al., 2005; Sharma and Lafontaine, 2015; Willi et al., 2018). Nous n'avons pas observé de différence sur la méthylation des riboses entre les plantes WT et *nas1,2,4* (données non montrées). Mais il est possible que les autres modifications proposées ci-dessus soient différemment réparties entre les plantes WT et mutantes, ouvrant ainsi la possibilité de créer des ribosomes hétérogènes.

De même, des protéines ribosomales différentes, ou l'absence de certaines PR, peuvent former un ribosome spécifique en cas de carence en fer (Rodríguez-Celma et al., 2013; Wang et al., 2013). Les PR composant les ribosomes, et les ribosomes eux-mêmes, peuvent également être modifiés de manière post-traductionnelle ce qui pourrait conférer une spécificité au ribosome pour sélectionner certains ARNm plutôt que d'autres (Genuth and Barna, 2018; Gilbert, 2011; Guo, 2018).

Dans ce contexte, il pourrait être très intéressant de réaliser un protéome nucléolaire chez les plantes *nas1,2,4* et dans des plantes WT en cas de carence/suffisance en fer, ainsi qu'un séquençage des ARNPs au sein des ribosomes, pour détecter un polymorphisme de séquence et/ou voir si une forme est plus enrichie qu'une autre. Nous pourrions aussi analyser leurs modifications chimiques. Les mêmes analyses pourraient être envisagées avec ces protéines ribosomales associées aux ribosomes en cours de traduction. Enfin nous pourrions faire un séquençage des ARNm associés aux ribosomes, et donc en cours de traduction, afin de définir la spécificité de traduction des ribosomes hétérogènes produits.

L'absence de fer dans les nucréoles aux stades précoce s de croissance des plantes (données non publiées de l'ANR SUBCELIF) pourra it donc engendrer à la fois une non répression du NOR2, et une altération de la transcription de l'ARNPol I, soit parce qu'elle est moins active, soit parce qu'elle s'associe moins aux copies d'ADNr (Figure 39). Des protéines contenant du fer, régulées par l'oxydo-réduction et/ou par des protéines à cœur fer-soufre (ou hème) pourraient alors participer à la voie de biogénèse des ribosomes (comme MET18 ou ROS1 par exemple). Par ailleurs, même si nous ne l'avons pas observé, il est possible que des ribosomes hétérogènes se forment chez le mutant *nas1,2,4* et chez le WT en carence en fer. Le fer pourrait donc être un acteur de la biogénèse des ribosomes par différentes voies et donc différentes répercussions. Il faut toutefois se rappeler que le fer nucléolaire est sûrement présent pour d'autres fonctions, ou pour stockage et/ou détoxicification. Ces données laissent donc entrevoir de nouvelles perspectives sur le rôle des ions métalliques et la régulation de l'oxydo-réduction en général d'une part sur la biogénèse des ribosomes, mais aussi sur les autres fonctions nucléolaires.

MATÉRIEL et MÉTHODES

Matériel biologique

Les plantes

Les plantes mutantes et sauvages (WT) utilisées dans cette thèse sont toutes des *Arabidopsis thaliana* écotype Col-0, voir Tableau 1.

Génotype	Protéine	Gène	Mutation	Méthode de mutation	Mutant	Publication
Col-0	WT					
	<i>fer</i>					obtenu par S. Mari
	<i>nas1</i>	NAS1	At5g04950	Knock Out	insertion T-DNA	GABI_223A09
	<i>nas2</i>	NAS2	At5g56080	Knock Out	insertion T-DNA	SAIL_156C08
	<i>nas3</i>	NAS3	At1g09240	Knock Out	insertion T-DNA	GABI_010A10
	<i>nas4</i>	NAS4	At1g56430	Knock Out	insertion T-DNA	SALK_135507
	<i>nuc1.2</i>	NUC1	At1g48920	Knock Out	insertion T-DNA	SALK_502764
	<i>nuc2.2</i>	NUC2	At3g18610	Knock Out	insertion T-DNA	GABI_178D01
	<i>rpt2a-2</i>	RPT2a	At4g29040	Knock Out	insertion T-DNA	SALK_005596
	<i>rpt5a-4</i>	RPT5a	At3g05530	Knock Out	insertion T-DNA	SALK_046321
	<i>ysl</i>					obtenu par S. Mari
	Fib2-YFP	FIB2	At4g25630	Surexpression	insertion T-DNA	35S::Fib2-YFP
						Pontvianne et al., 2017

Tableau 1 : Plantes d'*Arabidopsis thaliana* utilisées lors de ce travail de thèse

Les conditions de culture

Les conditions de culture des plantes, pour chaque expérimentation, sont décrites dans les deux articles du manuscrit et répertoriées dans le Tableau 2 ci-après.

En cas de culture *in vitro*, les graines sont stérilisées dans deux bains successifs de 3min d'éthanol 70% (supplémenté de 0,05% SDS), puis rincées dans trois bains de 3 min d'éthanol absolu avant d'être séchées. Le milieu Murashige et Skoog (Duchefa Biochemie M0231) est utilisé à 4,7g/L et supplémenté de 0,5g/L MES pour obtenir du MS 1X. Le pH est ajusté à 5,7 avec une solution de KOH. Pour un milieu gélosé, 10g/L de Plant agar (Gold Biotechnology) sont ajoutés.

Manip	Graines/Génotypes	Stratification	Conditions de culture "normales"						Conditions de culture "STRESS"						Tissu récolté	Méthode de récolte	
			Temps	Milieu	Lieux	Éclairage	Temps	T°c	%RH	Temps	T°c	%RH	Temps	Milieu	Température		
Protéome Nucéolaire 22°C/37°C	WT 35S:Fin2-YFP	2 jours en chambre froide	20 jours + 1 jour "témoin"	Terre (1/5 vermiculite et 4/5 terreau)	Persival	180µE.m ⁻² .s ⁻¹	16h	22°C	55%	8h	20°C	60%	24h (1 jour)		37°C	Limbe (sans pétiole) avec pinces	Fixation et extraction FACS
Papier protéasome 26S : Microscopie + Activité protéasome + Biologie moléculaire	WT (+35S:Fin2-YFP) <i>muc1.2</i> (+35S:Fin2-YFP) <i>rpl2a-2</i> <i>rpt2a-1</i>	2 jours en chambre froide	14 jours + 1 jour "témoin"	MS 1X + 1% saccharose	Persival	180µE.m ⁻² .s ⁻¹	16h	22°C	55%	8h	20°C	60%	24h (1 jour)	MS 1X + 1% saccharose (liquide) + DMSO (contrôle) ou + 50µM MG132 ou + 50µM ALLN			Plantules entières avec pinces
Expériences fer : Biologie moléculaire + FISH	WT <i>nic1.2</i> <i>nic2.2</i> <i>nas1</i> <i>nas2.2,4</i> <i>nas2.3,4</i> <i>nas1.2,3</i> <i>nas1.3,4</i> <i>ysl</i> <i>for</i>	2 jours en chambre froide	21 jours (3 semaines)	Terre (1/5 vermiculite et 4/5 terreau)	Chambre de culture	100µE.m ⁻² .s ⁻¹	16h	20°C	60%	8h	20°C	60%				Partie aérienne avec lame de rasoir	Azote liquide
Expériences fer : Microscopie + Contenu NA + Activités Redox	WT <i>nas1.2,4</i> <i>nas2.3,4</i>	2 jours en chambre froide	1,5 jours	MS 1X + 1% saccharose	Chambre de culture <i>in vitro</i>	120µE.m ⁻² .s ⁻¹	16h	22°C	55%	8h	20°C	60%				Plantules entières avec pinces	Azote liquide
Expériences fer : Phénotypage	WT <i>nas1.2,4</i> <i>nas2.3,4</i>																

Tableau 2 : Conditions de culture des plantes

Méthodes relatives à l'ADN et aux ARN

Extraction ADN / ARN / Chromatine

Les extractions d'ADN, ARN et chromatine ont été réalisées à partir de plantes/feuilles broyées finement dans l'azote liquide.

Pour l'ADN, nous avons utilisés le DNeasy® plant Mini Kit (Qiagen) et le kit DNA extraction, illustra™ Nucleon™ PhytoPure™ (GE Healthcare), selon les instructions des fabricants. Pour traiter l'ADN au bisulfite, il faut que l'ADN soit très pur, d'où l'utilisation du kit PhytoPure™.

Pour l'ARN, nous avons réalisé une extraction au Trizol (TRI Reagent® ; Molecular Research Center, Inc.) – Chloroforme : 5ml de Trizol sont ajoutés à 800 mg de tissus broyés. Le mélange vortexé est incubé 2 min à température ambiante, puis additionné de 1mL de chloroforme froid (4°C), vortexé et à nouveau incubé pendant 3 min à température ambiante avant d'être centrifugé 15 min à 4°C, à 8000 g. La phase aqueuse (environ 3mL) est transférée dans un nouveau tube et les ARN sont précipités par l'ajout de 3mL d'isopropanol froid (4°C) puis incubés 30 min dans de la glace. Après centrifugation (30 min à 4°C, 8000 g), le surnageant est remplacé par 5mL d'éthanol 75° DEPC (Diethyl pyrocarbonate, RNase free) et les ARN sont placés à -20°C pendant une nuit. Le lendemain, les ARN sont séchés à l'air libre avant d'être repris dans 90µL d'eau DEPC à 65°C. Les ARN sont traités à la DNase afin d'éliminer tout contaminant éventuel d'ADN. Pour cela, les ARN totaux sont traités avec le TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen) selon les indications du fabricant.

Pour la chromatine, 3g de poudre sont resuspendus dans 15mL de tampon Honda (0,44M Saccharose ; 1,25% (w/v) Ficoll ; 2,5% (w/v) Dextran T40 ; 20mM Hepes KOH (pH7,4) ; 10mM MgCl₂ ; 0,5% (v/v) Triton X-100 ; 0,5mM DTT) supplémenté avec une tablette cOmplete Maxi, EDTA-free protease inhibitor (Roche) pour 50mL de tampon. Ce mélange est filtré sur un Miracloth (Millipore) puis complété avec 1% de solution formaldéhyde (37% formaldéhyde dans 10-15% de méthanol stabilisé) et incubé 15min à 4°C sous agitation pour la fixation. La réticulation est stoppée par l'ajout d'un volume de solution de glycine (1,25N de glycine dans du tampon Honda), sous agitation pendant 10min. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2000 g pendant 15min à 4°C et le culot, contenant les noyaux, est resuspendu dans 1mL de tampon Honda. Cette étape de centrifugation/rinçage du culot s'effectue jusqu'à ce que le culot ne soit plus vert, puis il est finalement repris dans 500µL de tampon de lyse nucléaire (50mM Tris-HCl (pH 8), 10mM EDTA, 1% SDS) supplémenté d'une tablette cOmplete Mini, EDTA-free protease inhibitor (Roche) pour 10mL de tampon. Enfin, les échantillons sont soniqués à l'aide du Bioruptor UCD-200 (Diagenode, 6 cycles de 30sec avec 1min de pause, position High). Des aliquotes de 20µg d'ADN dans 100µL de tampon sont conservées à -80°C.

La concentration des acides nucléiques est déterminée à l'aide du Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

PCR / RT-PCR

Afin d'obtenir des ADNc (ADN complémentaire), les ARN ont été traités avec le kit SuperScript™ IV Reverse Transcriptase, Invitrogen (ThermoFisher Scientific), selon les instructions du fabricant. Pour les amores, nous avons utilisé 25mM d'amores « Random » et 25mM « d'oligo dT ». L'enzyme a été remplacée par de l'eau dans le contrôle négatif. Les ADNc obtenus ont ensuite été utilisés pour des PCR.

Les PCR ont été réalisées en utilisant les kits GoTaq® DNA Polymerase et 5X GoTaq® Green buffer (Promega) selon les instructions du fabricant.

Les produits PCR ont été analysés après leur migration à 70V sur un gel d'agarose 2% (contenant 1% de GelRed®, Biotium) dans du tampon TAE 0,5X (20mM Tris base, 10mM Acide acétique, 0,5mM EDTA pH8). Le marqueur de taille 1Kb Plus DNA Size Ladder (100 ng/μl, Gibco) est utilisé pour estimer la taille des fragments d'ADN sur le gel.

Les amores utilisées (en PCR et Northern blot) sont listées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Nomenclature équipe	Nom	Sequence	Cible	Technique
JSV108	108-f	GACAGACTGTCCAAAACGCCACC	3'ETS variants	PCR / RT-PCR
JSV109	109-r	CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT		
JSV112	112-f	GGATATGATGYAAATGTTTGTA	ADNr -315/+243	Takara PCR (Bisulfite)
JSV113	113-r	CCCATTCCTCRACRATTCA		
JSV124	124-f	TGGATAGTGAGAATAATAAGTGAAGAG	3'ETS variants	Séquençage Bisulfite
JSV125	125-r	TCATCCATCATTAACTAAATTCT		
	T7	TAATACGACTACTATAGG	Plasmide pGem-T	Northern blot
	SP6	TATTTAGGTGACACTATAG		
JSV152	p23	GTTCCAACATACTACCGAAGTAC	Entre les sites de clivage P et P'	
JSV157	p43	CACTTTCTGCGGGGTTTGTG	Entre les sites de clivage A ₂ et A ₃	
JSV159	p5	GGATGGTGAAGGACGACGATTGTG	Entre les sites de clivage 5,8S et C	
JSV160	p6	CGTTAAGGAGCTGTGCTTGTAGTGTAG	Entre le 25S et les variants en 3'ETS	
JSV24	p25S	CCGATTTCAAGCTGGCTTCCCGTTG	25S	
JSV31	p18S	GTCCTTCCATAAGTCGGGTTGTTGCACG	18S	
JSV490	45S promoter	AATAGCCCTTTCCCTTGGCACCAACAGACATTG	siRNA issu de la séquence promotrice des ADNr 45S	
JSV136	sir759	GAAGTCTGGACCTGGTCGACAA	siRNA 759	

Tableau 3 : Liste des amores utilisées pour les différentes méthodes de ce travail de thèse

Traitement de l'ADN au Bisulfite et analyses

Les ADN (400ng) extraits avec le kit PhytoPure™ ont été traités au Bisulfite (les cytosines méthylées sont converties en thymines) avec le kit EpiTect Plus Bisulfite Conversion (Qiagen) selon les recommandations du fabricant sauf le programme utilisé qui est le suivant:

- 1 95°C, 2 min
- 2 75°C, 2 h
- 3 95°C, 1 min, retour au -2 sur 7 fois (donc 8 cycles)
- 4 20°C à l'infini

Par la suite, l'ADN est amplifié par PCR avec l'enzyme *TaKaRa Ex Taq DNA polymerase™ Hot Start Version* (TaKaRa Bio Inc.) selon les indications du vendeur.

Les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose, purifiés avec le kit GeneClean® Turbo kit (MP Biomedicals) puis clonés dans le pGEM®-T Vector (kit de Promega). Des *E. coli* DH5α ont été transformées (par choc thermique) avec ce construct puis mises en culture sur du milieu sélectif : Lysogeny Broth (LB), 0,1mg/mL Ampicilline, 0,04mg/mL X-Gal. Les

colonies positives (blanches) sont vérifiées par PCR en utilisant les amores T7 et SP6. Après criblage, les échantillons PCR sont traités avec le kit Sap-ExoI (Roche) avant d'être séquencés à partir des amores T7 et SP6. Les séquences obtenues sont alignées à une séquence de référence et l'alignement est analysé par l'outil CyMATE. Les résultats obtenus sont traités avec une fonction « prop.test » sur le logiciel R software, nous permettant de voir les sites différentiellement méthylés.

Immuno-précipitation de la Chromatine (ChIP)

Une aliquote de chromatine est diluée dix fois dans du tampon de dilution pour ChIP (1,1% (v/v) Triton X-100; 1,2mM EDTA; 16,7mM Tris-HCl (pH8); 167mM NaCl) puis centrifugée à vitesse maximum pendant 10min pour retirer un maximum de SDS. Le surnageant est placé dans un tube siliconé puis la chromatine est incubée avec l'anticorps souhaité (voir Tableau 5) sous agitation douce toute la nuit à 4°C.

25µL de Protein A et 25µL de Protein G (Dynabeads, Invitrogen) sont équilibrées 3 fois dans 1mL de tampon de ligation à 150mM NaCl (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8), 2mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% SDS), reprises dans 50µL de ce même tampon et ajoutées à la solution de chromatine-anticorps. Le mélange est incubé 1h sous agitation lente puis lavé 6 fois 5min avec du tampon de ligation à 500mM NaCl (500mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8), 2mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% SDS) et 2 fois 5min avec du tampon TE (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA), le tout en restant à 4°C. Dans un nouveau tube siliconé, le surnageant est remplacé par 100µL de 10% Chelex (BioRad). Le culot et le chelex sont chauffés à 95°C pendant 10min puis supplémentés de 1µL de Protéinase K (20mg/mL) avant d'être incubés à 55°C pendant 1h30. La réaction est stoppée par un chauffage de 10min à 95°C. Les échantillons sont centrifugés à vitesse maximale pendant 1min et 70µL du surnageant est collecté dans un nouveau tube.

Les échantillons sont donnés au service qPCR du laboratoire. Il suffit de 1µL d'échantillon pour une réaction qPCR.

Northern Blot

3µg d'ARN traités à la Turbo DNase sont mélangés à 10µL de formamide 100% et à 10µL de tampon de charge modifié (14 volumes de tampon de charge (2,1X de tampon TT (TT 50X : 1,5M Tricine, 1,5M Triéthanolamine), 1mM EDTA, 0,4µg/mL Bleu de Bromophénol) et 1 volume de formaldéhyde 37% ajouté au dernier moment). Les extraits sont dénaturés 5 min à 70°C puis refroidis à température ambiante avant d'être déposés sur gel d'agarose 1% (supplémenté de 1/20000 (v/v) de GelRed et 0,5% formaldéhyde). Après 3h à 3h30 de migration à 100V, le gel est démoulé et transféré sur une membrane de nylon Amersham Hybond™-N+ membrane (GE Healthcare) dans du tampon SSC 10X (1,5M NaCl, 150mM Citrate de sodium, ajusté à pH 7 avec du HCl) sur la nuit. La membrane est séchée à température ambiante puis les ARN sont fixés sur la membrane par une exposition aux rayons UV via le Stratalinker® UV Crosslinker. La membrane est pré-hybridisée pendant 3h à 42°C dans du tampon 1X PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich).

La sonde est marquée au [γ -32P]ATP (3000Ci/mmol, PerkinElmer) via la T4 Polynucleotide Kinase (Promega) selon le mélange réactionnel suivant:

- 1 μ L de sonde à marquer (10 μ M)
- 1,5 μ L tampon PNK 10X
- 1 μ L enzyme T4 Kinase
- 5 μ L [γ -32P]ATP
- 6,5 μ L eau distillée

Le mélange est incubé 1h à 37°C puis 35 μ L d'eau sont ajouté au mélange avant d'être purifié sur une colonne d'exclusion illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns (GE Healthcare).

Ensuite, la sonde radiomarquée est ajoutée dans le tampon d'hybridation où est placée la membrane. L'hybridation se fait sur la nuit à 42°C. La membrane est ensuite lavée dans du tampon 2X SSC- 0,1% SDS à 50°C pendant 15min (moins stringent) ou dans du tampon 2X SSC- 0,1% SDS à 50°C pendant 15min (plus stringent). Pour terminer, la membrane est exposée à un écran PhosphoImager puis révélée.

Séparation des monosomes/polysomes : Gradients de sucre

250 mg de feuilles des plantules de 3 semaines sont broyées finement dans de l'azote liquide puis resuspendues dans 750 μ L de tampon d'extraction (0,2M Tris-HCl pH9,0 ; 0,2M KCl ; 0,035M MgCl₂; 0,025M EGTA pH8,0) complémenté avec 1% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich D6750) ; 1% de mélange de détergent (0,5g Brij-35 ; 0,5mL Triton X100 ; 0,5mL Igepal ; 0,5mL Tween 20) ; 2% polyoxyethylene 10 tridecyl éther ; 5mM DTT ; 10 μ M MG132 ; 50 μ g·mL⁻¹ chloramphenicol ; 100 μ g·mL⁻¹ cycloheximide et 1% de cocktail enzymatique (Sigma-Aldrich P9599). Le tout est incubé 10min dans la glace puis centrifugé à 17000g pendant 10min à 4°C. Le surnageant est filtré à 0,45 μ m puis 360 μ L du filtrat sont déposés sur un gradient linéaire de 9mL allant de 15 à 60% de sucre. Les monosomes et polysomes migrent dans le gradient grâce à une centrifugation à 38000rpm de 3h dans le rotor SW41 (Beckman), à 4°C. La quantité d'ARN composant les monosomes et polysomes est détectée par leur absorbance à 254nm, lue par le détecteur UA-6 UV/VIS Detector (Teledyne ISCO) couplé à un système Type 11 Optical Unit (Teledyne ISCO). Le blanc est effectué avec du Saccharose 0,5M.

Un gradient est à la base composé de plusieurs couches (voir Tableau 5). La couche la plus dense (60%) est déposée en premier puis congelée à -80°C pendant 1h30. Les couches suivantes sont ajoutées de la même manière, en finissant par celle à 15%. Il se linéarise en passant une nuit à 4°C.

	Gradient 15% - 60% (9mL)			
	60%	45%	30%	15%
Saccharose 2M	1,32 mL	1,98 mL	1,32 mL	0,33 mL
Sucrose Salt 10X :	0,15 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,15 mL
0,4M Tris-HCl pH8,4 ; 0,2M KCl ; 0,1M MgCl ₂				
Chloramphenicol 50mg/mL	0,15 μ L	0,3 μ L	0,3 μ L	0,15 μ L
Cycloheximide 100mg/mL	0,15 μ L	0,3 μ L	0,3 μ L	0,15 μ L
Eau stérile	0,03 mL	0,72 mL	1,38 mL	1,02 mL

Volume TOTAL	1,5 mL	3 mL	3 mL	1,5 mL
--------------	--------	------	------	--------

Tableau 4 : Composition des couches d'un gradient de 9mL allant de 15 à 60% en sucre

Méthodes relatives aux protéines

Extraction et Révélations

Les protéines ont été extraites à partir de plantes/feuilles broyées finement dans l'azote liquide et resuspendues dans du tampon 1X SDS-Laemmli (62,5mM Tris-HCl pH6,7 ; 2% SDS ; 10% glycérol ; 0,05% bleu de bromophénol et 0,1M DTT). Les protéines sont dénaturées 5 min à 100°C avant d'être déposées.

Le gel permettant la séparation des protéines est composé de deux phases : une phase de concentration dite « stacking » (3% Acrylamide/Bis-Acrylamide (29:1) ; 0,125M Tris-HCl pH6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,1% TEMED) coulée sur une phase de séparation dite « resolving » (5 à 15% Acrylamide/Bis-Acrylamide (29:1) ; 0,375M Tris-HCl pH8,8 ; 0,1% SDS ; 0,032% APS et 0,04% TEMED). La migration des protéines s'effectue dans un tampon de migration (25mM Tris base, 192mM glycine et 0,1% SDS) par un courant de 20mA par gel pendant environ 1h. Après migration, le gel est démoulé et analysé par coloration ou bien par Western blot. Une des pistes est utilisée pour y déposer le marqueur de taille PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific).

Le gel peut être coloré dans une solution au bleu de Coomassie SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) pendant environ 50 min, sous agitation, puis décoloré à l'eau distillée.

Ou alors, les protéines peuvent être analysées par Western blot. Dans ce cas, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45µm (Bio-rad), pendant 90min à 100V, dans du tampon de Transfert (25mM Tris base, 192mM glycine, 20% éthanol 100°). La qualité du transfert est vérifiée par une coloration au rougeponceau (0,5% de ponceau S et 1% d'acide acétique) pendant 5min. La membrane est, par la suite, rincée abondamment à l'eau distillée avant d'être saturée, pendant 1h, dans une solution 1X T-TBS (20mM Tris base ; 136mM NaCl ; 0,1% Tween-20 ; le pH est ajusté à 7,6 avec de l'HCl) complétée à 5% de lait en poudre (lait acheté dans un commerce local). Après rinçage au 1X T-TBS, la membrane est hybridée sur la nuit dans une solution de 1X T-TBS à 5% en lait, à laquelle est ajouté l'anticorps spécifique à la dilution appropriée. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10min dans du 1X T-TBS puis incubée 1h en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG, couplé à l'enzyme peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase), dans du 1X T-TBS 5% en lait. La membrane est à nouveau rincée 3 fois 10min dans du 1X T-TBS avant d'être révélée avec le kit Immobilon (Millipore). L'hybridation des anticorps est détectée sur un film CLXposure™ Film (ThermoScientific) suite à une exposition variant de 10sec à 30min en chambre noire. La révélation est effectuée via le développeur automatique Automatic Autoradiography Film Processor (Amersham).

Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Manip	Anticorps	Type	Référence	Epitope	Animal	Dilution utilisée	Provenance / Publication
Papier Protéasome 26S	α-H3pan	polyclonal	07-690	C-terminale	Lapin	1 / 30 000	Merck-Millipore
	α-NUC1		P11244	peptide	Lapin	1 / 10 000	Pontvianne et al., 2010
	α-RPN1a	?		réalisé contre la protéine totale recombinante	Lapin	1 / 4 000 - 1 / 1 000 WB - Immunolocalisation	Wang et al., 2009
	α-RPN10	polyclonal		réalisé contre la protéine totale recombinante	Lapin	1/3000 - 1/1000 WB - Immunolocalisation	Lin et al., 2011
	α-PRXII	?	Donné par JPh Reichheld	réalisé contre la protéine totale recombinante	Lapin	1 / 20 000	Bréhélin et al., 2003
ChIP Fer	α-H3pan	polyclonal	07-690	C-terminale	Lapin	5µL / échantillon chromatine	Merck-Millipore
	α-H3K4me2	polyclonal	07-030	Diméthylation de Lys4 de H3	Lapin		
	α-H3Ac	polyclonal	06-599	Acétylation en N terminale	Lapin		
	α-H3K9me2	polyclonal	07-441	Diméthylation de Lys9 de H3	Lapin		

Tableau 5 : Anticorps utilisés pendant ce travail de thèse

Tri des nucléoles : FANoS

Cette technique consiste à trier spécifiquement les nucléoles grâce à la fluorescence de la protéine nucléolaire Fibrillarine. Pour cela, la fibrillarine a été fusionnée au gène rapporteur YFP (Yellow Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur 35S CMV (CytoMegaloVirus).

Après vérification de la fluorescence au microscope, les feuilles sans pétiole de plantules de 3 semaines sont prélevées et fixées 20min dans un tampon Tris froid (10mM Tris-HCl pH7,5 ; 10mM NaEDTA ; 100mM NaCl) contenant 4% de formaldéhyde. Après deux rinçages de 10min dans du tampon Tris froid, les feuilles sont hachées finement à l'aide d'une lame de rasoir dans 500µL de tampon FACS (45mM MgCl₂ ; 20mM MOPS pH7 ; 30mM citrate de sodium et 0,1% de Triton X-100) puis le liquide est filtré sur la glace à travers un filtre de 30µm CellTrics® (Partec). Le filtrat est alors récupéré et soniqué à l'aide du Bioruptor UCD-200 (Diagenode), 3 cycles de 5min avec 30sec d'intervalle en position Medium. Les nucléoles sont ensuite triés *via* le trieur ARIA II (BD Bioscience), avec l'aide de Mme Boyer-Clavel Myriam à la plateforme MRI de Montpellier. Les réglages du trieur ARIA II sont disponibles dans le protocole publié par Pontvianne et al. (2016).

Les nucléoles triés sont envoyés à la plateforme LSMBO de Strasbourg, afin d'être analysés par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie liquide (LC-MS/MS). Ces analyses sont réalisées par Mme Carapito Christine et Mlle Opsomer Alison.

Séparation noyau / cytoplasme pour les essais d'activité du protéasome

Des plantules (2g) de 15 jours ont été broyées dans de l'azote liquide et homogénéisées dans 6mL de tampon d'extraction (20mM HEPES/KOH, 10mM MgCl₂, 0,5M Hexylene glycol). Le mélange est filtré au travers d'un Miracloth (EMD Millipore Corporation) et d'une toile à bluter (Sefar AG, 31µm). Le filtrat est complémenté par 0,5% de Triton X-100, incubé sur une roue pendant 15min à 4°C, puis centrifugé à 1000g pendant 10min à 4°C. Le surnageant correspond à la fraction cytoplasmique. Les noyaux sont lavés dans 1mL de tampon d'extraction complémenté avec 0,5% de Triton X-100, centrifugés à 1000g pendant 10min à 4°C et enfin sont resuspendus dans 150 µL de tampon d'extraction-0,5% Triton X-100. Pour l'analyse de l'activité protéasomale, 1µg de protéines ont été utilisées.

Extraction des protéines totales et mesure de l'activité protéasomale

Les extraits totaux ont été obtenus à partir de plantules de 15 jours broyées dans l'azote liquide, homogénéisées 1,5 volume de tampon d'extraction (50mM HEPES/KOH, 2mM MgCl₂, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) et incubées pendant 30min à température ambiante, en vortexant toutes les 10min. Les échantillons ont été centrifugés à 22000g pendant 20min à 4°C et le surnageant récupéré. Pour le test d'activité enzymatique, 2µg de protéines totales ont été utilisées.

Pour mesurer l'activité du protéasome, nous avons utilisé le 20S Proteasome Activity Assay Kit (ChemiconR International) en suivant les indications du fabricant. La fluorescence a été déterminée par l'utilisation du Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific), avec une excitation à 355nm et une émission mesurée à 460nm.

Activité Redox

Les activités Catalase (CAT) et Ascorbate peroxydase (APX) sont mesurées grâce à la détection du peroxyde d'hydrogène à 240nm, dans des cuves en quartz. Pour ce faire, 100mg de feuilles de plantes de trois jours sont broyées dans de l'azote liquide et resuspendues dans 300µL de 50mM Tris-HCl pH7. Pour l'activité CAT, 2mL de 50mM Tris-HCl pH7 et 40µL d'eau sont complétés avec 2, 4, 8 et 16µL d'échantillon. Pour l'activité APX, 2mL de 50mM Tris-HCl pH7, 10µL de 100mM Ascorbate et 20µL de 10mM H₂O₂ sont supplémentés avec 100µL d'échantillon.

Méthodes de microscopie

DAB

La révélation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par coloration au DAB a été réalisée sur des plantules de 15 jours. Elles sont plongées dans 5mL d'une solution de MES/DAB (20mL de 0,5mg/mL MES pH5,7 and 1mL de DAB (3'-Diaminobenzidine) chaud) et placées sous vide à l'obscurité jusqu'à observer un noircissement des tissus. La chlorophylle est retirée par des lavages successifs dans de l'éthanol 75°. Les plantules ont ensuite été observées sous une loupe binoculaire Leica MZ12.

Structure du nucléole par fluorescence

Des plantes Fib2-YFP de 15 jours sont fixées dans du tampon Tris froid (10mM Tris- HCl pH7,5, 10mM EDTA, 100mM NaCl) contenant 4% de formaldéhyde pendant 20min puis rincée deux fois 10min avec du tampon Tris. Les feuilles sont ensuite hachées finement à l'aide d'une lame de rasoir dans 500µL de tampon LB01 (15mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM NaEDTA, 0.5mM spermine, 80mM KCl, 20mM NaCl, 0.1% Triton X-100) puis le liquide est filtré sur la glace à travers un filtre de 30µm CellTrics® (Partec). Le filtrat est additionné d'un volume égal de tampon de tri (100mM Tris-HCl pH7,5 ; 50mM KCl ; 2mM MgCl₂ ; 0,05% Tween-20 ; 5% saccharose ; filtré à 0,45µm) avant d'être déposé (20µL) sur une lame en polysine. La lame est séchée à l'air libre puis fixée dans du tampon 1X PBS (137mM NaCl ; 2,7mM KCl ; 10mM Na₂HPO₄ ; 1,8mM KH₂PO₄) contenant 2% de formaldéhyde pendant

5min et enfin rincée deux fois au 1X PBS. La lame est montée avec 18µL d'un mélange Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole à une concentration finale de 1µg/mL). Les observations et images sont réalisées et obtenues sur un microscope confocal LSM 700 (Zeiss).

Structure du nucléole par microscopie électronique

Des racines de plantules de 5, 10 et 15 jours sont fixées dans du tampon 0,025M cacodylate (pH7.3) complémenté avec 3% (v/v) de glutaraldéhyde à température ambiante. Après rinçage, les échantillons sont placés dans le même tampon que précédemment, complémenté avec 1% OsO₄. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains de méthanol en série (30, 50, 70 and 100%) à température ambiante. Puis ils sont acétylés et méthylés avec un mélange de 5:1 (v/v) méthanol/ acide acétique anhydride à 25°C. Les échantillons sont lavés dans du méthanol pur avant d'être inclus dans de la résine Epon 812. Des couches très fines sont découpées avec l'ultramicrotome (Leica Ultracut), marquées avec de l'acétate d'uranyle et dépourvues de citrate avant d'être observées au microscope électronique à transmission 7500 Hitachi TEM. La préparation des échantillons et leur observation ont été réalisées à l'Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer, avec l'aide de Mme Escande Marie-Line.

BIBLIOGRAPHIE

Abou-Ellail, M., Cooke, R., and Sáez-Vásquez, J. (2011). Variations in a team: Major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* 2, 294–299.

Albert, A.-C., Denton, M., Kermekchiev, M., and Pikaard, C.S. (1999). Histone Acetyltransferase and Protein Kinase Activities Cooperate with a Putative *Xenopus* RNA Polymerase I Holoenzyme Self-Sufficient for Promoter-Dependent Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19, 796–806.

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

An, W., Du, Y., and Ye, K. (2018). Structural and Functional Analysis of Utp24, an Endonuclease for Processing 18S ribosomal RNA. *PLOS ONE* 13, e0195723.

Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.-E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77–83.

Arabi, A., Rustum, C., Hallberg, E., and Wright, A.P.H. (2003). Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *Journal of Cell Science* 116, 1707–1717.

Armistead, J., and Triggs-Raine, B. (2014). Diverse diseases from a ubiquitous process: The ribosomopathy paradox. *FEBS Letters* 588, 1491–1500.

Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2007). Diverse Subcellular Locations of Cryptogein-Induced Reactive Oxygen Species Production in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *PLANT PHYSIOLOGY* 143, 1817–1826.

Audas, T.E., Jacob, M.D., and Lee, S. (2012a). Immobilization of Proteins in the Nucleolus by Ribosomal Intergenic Spacer Noncoding RNA. *Molecular Cell* 45, 147–157.

Audas, T.E., Jacob, M.D., and Lee, S. (2012b). The nucleolar detention pathway: A cellular strategy for regulating molecular networks. *Cell Cycle* 11, 2059–2062.

Bach, S.V., and Hegde, A.N. (2016). The proteasome and epigenetics: zooming in on histone modifications. *Biomolecular Concepts* 7, 215–227.

Bailey, R.P., Vrooman, M.J., Sawai, Y., Tsukada, K., Short, J., and Lieberman, I. (1976). Amino acids and control of nucleolar size, the activity of RNA polymerase I, and DNA synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 3201–3205.

Balk, J., and Pilon, M. (2011). Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science* 16, 218–226.

Balk, J., and Schaedler, T.A. (2014). Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 125–153.

Banerjee, D., McDaniel, P.M., and Raymond, B.C. (2015). Limited Portability of G-Patch Domains in Regulators of the Prp43 RNA Helicase Required for Pre-mRNA Splicing and Ribosomal RNA Maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 200, 135–147.

Barneche, F., Gaspin, C., Guyot, R., and Echeverría, M. (2001). Identification of 66 box C/D snoRNAs in *A rabidopsis thaliana*: extensive gene duplications generated multiple isoforms predicting new ribosomal RNA 2'-O-methylation sites. *Journal of Molecular Biology* 311, 57–73.

Barthelme, D., Scheele, U., Dinkelaker, S., Janoschka, A., MacMillan, F., Albers, S.-V., Driessens, A.J.M., Stagni, M.S., Bill, E., Meyer-Klaucke, W., et al. (2007). Structural Organization of Essential Iron-Sulfur Clusters in the Evolutionarily Highly Conserved ATP-binding Cassette Protein ABCE1. *Journal of Biological Chemistry* 282, 14598–14607.

Bassy, O., Jimkez-Garcia, L.F., Echeverria, O.M., Vazquez-Nin, G.H., and Moreno Diaz de la Espina, S. (2000). High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by in situ hybridization. *Biology of the Cell* 92, 59–70.

Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ignatova, Z., Plitzko, J.M., and Wilson, D.N. (2018). Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1. *Nature Microbiology* 3, 1115–1121.

Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.

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

Bhat, K.P., and Greer, S.F. (2011). Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 150–155.

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

Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. (2006). The PINc domain protein Utp24, a putative nuclelease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9464–9469.

Bodem, J., Dobreva, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., and Grummt, I. (2000). TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Reports* 1, 171–175.

Bogenhagen, D.F., and Brown, D.D. (1981). Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. *Cell* 24, 261–270.

Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 574–585.

Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379–390.

Borisjuk, N.V., Davidjuk, Y.M., Kostishin, S.S., Miroshnichenko, G.P., Velasco, R., Hemleben, V., and Volkov, R.A. (1997). Structural analysis of rDNA in the genus Nicotiana. *Plant Molecular Biology* 35, 655–660.

Boulon, S., Westman, B.J., Hütten, S., Boisvert, F.-M., and Lamond, A.I. (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell* 40, 216–227.

Brangwynne, C.P., Mitchison, T.J., and Hyman, A.A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines the size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4334–4339.

Briat, J.-F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., Cellier, F., and Gaymard, F. (2010). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* 105, 811–822.

Briat, J.-F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science* 20, 33–40.

Brown, D.D., and Gurdon, J.B. (1964). Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 51, 139–146.

Brown, J.W.S., and Shaw, P.J. (1998). Small Nucleolar RNAs and Pre-rRNA Processing in Plants. *The Plant Cell* 10, 649–657.

Brown, J.W.S., and Shaw, P.J. (2008). The Role of the Plant Nucleolus in Pre-mRNA Processing. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, A.S.N. Reddy, and M. Golovkin, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 291–311.

Brown, J.W.S., Echeverria, M., and Qu, L.-H. (2003). Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression. *Trends in Plant Science* 8, 42–49.

Byrne, M.E. (2009). A role for the ribosome in development. *Trends in Plant Science* 14, 512–519.

Calviño, F.R., Kharde, S., Ori, A., Hendricks, A., Wild, K., Kressler, D., Bange, G., Hurt, E., Beck, M., and Sinning, I. (2015). Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nature Communications* 6, 1–8.

Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A., and Town, C.D. (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 112, 225–228.

Casafont, I., Bengoechea, R., Navascués, J., Pena, E., Berceano, M.T., and Lafarga, M. (2007). The giant fibrillar center: A nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active senescent ganglia neurons. *Journal of Structural Biology* 159, 451–461.

Caudron-Herger, M., Pankert, T., Seiler, J., Nemeth, A., Voit, R., Grummt, I., and Rippe, K. (2015). Alu element-containing RNAs maintain nucleolar structure and function. *The EMBO Journal* 34, 2758–2774.

Caudron-Herger, M., Pankert, T., and Rippe, K. (2016). Regulation of nucleolus assembly by non-coding RNA polymerase II transcripts. *Nucleus* 7, 308–318.

Cech, T.R. (2000). The Ribosome Is a Ribozyme. *Science* 289, 878–879.

Chamousset, D., M amane, S., B oisvert, F.-M., a nd T rinkle-Mulcahy, L . (2010). E fficient extraction of nucleolar proteins for interactome analyses. PROTEOMICS 10, 3045–3050.

Chandrasekhara, C., M ohannath, G., B levins, T., P ontvianne, F., a nd Pikaard, C.S. (2016). Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in *Arabidopsis*. Genes & Development 30, 177–190.

Chen, S., Yin, C., Strasser, R.J., Govindjee, Yang, C., and Qiang, S. (2012). Reactive oxygen species f rom chloropl asts contribute to 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid-induced leaf necrosis of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 52, 38–51.

Chen, W., Xie, Z., Yang, F., and Ye, K. (2017). Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast. Nucleic Acids Research 45, 6837–6847.

Choque, E., Schneider, C., Gadal, O., and Dez, C. (2018). Turnover of aberrant pre-40S pre-ribosomal particles is initiated by a novel endonucleolytic decay pathway. Nucleic Acids Research 46, 4699–4714.

Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.-C., Picard, G., and Tourmente, S . (2002). Analysis of the 5S RNA Pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs Are Heterogeneous and Only Two of the Genomic 5S Loci Produce Mature 5S RNA. Genome Research 12, 132–144.

Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M., and Tourmente, S. (2003). In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. The Plant Journal 35, 251–261.

Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., Jobet, E., Brugidou, E., Echeverria, M., and Sáez-Vásquez, J. (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3ETS in *Arabidopsis*. Nucleic Acids Research 36, 1163–1175.

Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., and Sogo, JoséM. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. Cell 57, 753–761.

Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., and Squires, C.L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrn inactivation. Journal of Bacteriology 177, 4152–4156.

Connerton, J.M., Balk, J., and Rodríguez-Celma, J. (2017). Iron homeostasis in plants – a brief overview. Metallomics 9, 813–823.

Cooper, G.M. (2000). Chapter 8: The Nucleolus. In The Cell : A Molecular Approach. 2nd Edition, p.

Cordesse, F., Cooke, R., Tremousaygue, D., Grellet, F., and Del seny, M . (1993). Fine structure and evolution of the rDNA intergenic spacer in rice and other cereals. Journal of Molecular Evolution 36, 369–379.

Darbani, B., B riat, J .-F., H olm, P.B., H usted, S., N oeparvar, S., a nd B org, S . (2013). Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. Biotechnology Advances 31, 1292–1307.

Delcasso-Tremousaygue, D., Grellet, F., P anabieres, F., A naniev, E.D., and D elseny, M. (1988). Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant. European Journal of Biochemistry 172, 767–776.

Delseny, M., Aspart, L., Cooke, R., Grellet, F., and Penon, P. (1979). Restriction analysis of radish nuclear genes coding for rRNA: Evidence for heterogeneity. Biochemical and Biophysical Research Communications 91, 540–547.

Derenzini, M., Montanaro, L., and Treré, D. (2009). What the nucleolus says to a tumour pathologist. Histopathology 54, 753–762.

Distefano, A.M., Martin, M.V., Córdoba, J.P., Bellido, A.M., D'ippólito, S., Colman, S.L., Soto, D., Roldán, J.A., Bartoli, C.G., Zabaleta, E.J., et al. (2017). Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. The Journal of Cell Biology 216, 463–476.

Doelling, J.H., and Pikaard, C.S. (1995). The minimal rRNA gene promoter of *Arabidopsis thaliana* includes a critical element at the transcription initiation site. The Plant Journal 8, 683–692.

Doelling, J.H., Gaudino, R.J., and Pikaard, C.S. (1993). Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA gene and spacer promoters in vivo and by transient expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 90, 7528–7532.

Dubeaux, G., Naveau, J., Zelazny, E., and Vérit, G. (2018). Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. Molecular Cell 69, 953–964.

Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., de Bures, A., Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., et al. (2014). A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. The Plant Cell 26, 1330–1344.

Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blewitt, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. Genes & Development 24, 1119–1132.

van den Elzen, A.M.G., Schuller, A., Green, R., and Séraphin, B. (2014). Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. The EMBO Journal 265–276.

Emmott, E., Wise, H., Loucaides, E.M., Matthews, D.A., Digard, P., and Hiscox, J.A. (2010). Quantitative Proteomics Using SILAC Coupled to LC/MS Reveals Changes in the Nucleolar Proteome in Influenza A Virus-Infected Cells. Journal of Proteome Research 9, 5335–5345.

Endoh, M., Endoh, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., et al. (2012). Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. PLoS Genetics 8, 1–10.

- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S.E., Garcia, M., Laforêts, F., Marcell, V., Baudin-Baillieu, A., et al. (2017). Evidence for rRNA'2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, 12934–12939.
- Ezhkova, E., and Tansey, W.P. (2004). Proteasomal ATPases Link Ubiquitylation of Histone H2B to Methylation of Histone H3. *Molecular Cell* *13*, 435–442.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* *14*, 313–318.
- Fátoly, K., and Grummt, I. (2008). Proteasomal ATPases are associated with rDNA: The ubiquitin proteasome system plays a direct role in RNA polymerase I transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* *1779*, 850–859.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2001). The 19S Regulatory Particle of the Proteasome Is Required for Efficient Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell* *7*, 981–991.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* *165*, 1686–1697.
- Fernández-Pevida, A., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2015). Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* *6*, 191–209.
- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U.J., Taylor, N.M.I., Ruiz, F.M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., and Müller, C.W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature* *502*, 644–649.
- Fontana, F. (1781). *Traité sur le venin de la vipère, sur les poisons américains, sur le laurier cerise et sur quelques autres poisons végétaux. On y a joint des observations sur la structure primitive du corps animal, différentes expériences sur la reproduction des nerfs et la description d'un nouveau canal de l'oeil.* (Florence).
- Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Lyon, C.E., Andersen, J., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Paraspeckles: A Novel Nuclear Domain. *Current Biology* *12*, 13–25.
- Galimberti, V., Kinor, N., Shav-Tal, Y., Biggiogera, M., and Brüning, A. (2016). The stress-inducible transcription factor A TF4 accumulates at specific rRNA-processing nucleolar regions after proteasome inhibition. *European Journal of Cell Biology* *95*, 389–400.
- Gaspin, C., Rami, J.-F., and Lescure, B. (2010). Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biology* *10*, 1–12.
- Gaudino, R.J., and Pikaard, C.S. (1997). Cytokinin induction of RNA Polymerase I Transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 6799–6804.
- Geng, F., and Tansey, W.P. (2012). Similar temporal and spatial recruitment of native 19S and 20S proteasome subunits to transcriptionally active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 6060–6065.

Genuth, N.R., and Barna, M. (2018a). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nature Reviews Genetics* 19, 431–452.

Genuth, N.R., and Barna, M. (2018b). The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Molecular Cell* 71, 364–374.

Gilbert, W.V. (2011). Functional specialization of ribosomes? Trends in Biochemical Sciences 36, 127–132.

Gillette, T.G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S.A., and Kodadek, T. (2004). Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 5904–5909.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science* 112, 761–772.

Godward, M.B.E. (1950). On the Nucleolus and Nucleolar-organizing Chromosomes of Spirogyra. *Annals of Botany* 14, 39–53.

Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2002). Recruitment of a 19S Proteasome Subcomplex to an Activated Promoter. *Science* 296, 548–550.

González-Melendi, P., Wells, B., Beven, A.F., and Shaw, P.J. (2001). Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *The Plant Journal* 27, 223–233.

Goodfellow, S.J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2013). Basic Mechanisms in RNA Polymerase I Transcription of the Ribosomal RNA Genes. *Subcell Biochem*. 1–26.

Granboulan, N., and Granboulan, P. (1964). Cytochimie ultrastructurale du nucléole: I. Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du Nucléole. *Experimental Cell Research* 34, 71–87.

Granboulan, N., and Granboulan, P. (1965). Cytochimie ultrastructurale du nucléole. Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau. *Experimental Cell Research* 38, 604–619.

Greber, B.J. (2016). Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA* 22, 1643–1662.

Grillet, L., Mari, S., and Schmidt, W. (2014). Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Front. Plant Sci.* 4, 1–8.

Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K., and Schweizer, D. (1991). rDNA Intergenic Region from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology* 221, 1209–1222.

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

Grummt, I. (2007). Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Human Molecular Genetics* 16, R21–R27.

Grummt, I. (2010). Wisely chosen paths – regulation of rRNA synthesis. *The FEBS Journal* 277, 4626–4639.

Grummt, I., and Pikaard, C.S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 641–649.

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

Guo, H. (2018). Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochemical Society Transactions* 1–15.

Hanania, U., Velcheva, M., Sahar, N., Flaishman, M., Or, E., Dgani, O., and Perl, A. (2009). Suppression and overexpression of ubiquitin extension protein S27a affects cell proliferation and in vitro regeneration in Nicotiana benthamiana. *Plant Science* 176, 566–574.

Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., et al. (2003). mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF. *Molecular and Cellular Biology* 23, 8862–8877.

Hannan, R.D., Cavanaugh, A., Hempele, W.M., Moss, T., and Rothblum, L. (1999). Identification of a mammalian RNA polymerase I holoenzyme containing components of the DNA repair/replication system. *Nucleic Acids Research* 27, 3720–3727.

Hantzis, L.J., Kroh, G.E., Jahn, C.E., Cantrell, M., Peers, G., Pilon, M., and Ravet, K. (2018). A Program for Iron Economy Using Efficiency Targets Specific for Proteins. *Plant Physiology* 176, 596–610.

Harper, F., and Puvion-Dutilleul, F. (1979). NON-NUCLEOLAR TRANSCRIPTION COMPLEXES OF RAT LIVER AS REVEALED BY SPREADING ISOLATED NUCLEI. *Journal of Cell Science* 40, 181–192.

Havlová, K., Dvořáčková, M., Peiro, R., Abia, D., Mozgová, I., Vansáčová, L., Gutierrez, C., and Fajkus, J. (2016). Variation of 45S rDNA intergenic spacers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 92, 457–471.

He, J.-S., Soo, P., Evers, M., Parsons, K.M., Heintz, N., Hannan, K.M., Hannan, R.D., and George, A.J. (2018). High-Content Imaging Approaches to Quantitate Stress-Induced Changes in Nucleolar Morphology. *ASSAY and Drug Development Technologies* 16, 320–332.

Heaney, M.M., and Finberg, K.E. (2014). Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 28, 637–652.

Heitz, E. (1931). Nukleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta* 15, 495–505.

Henle, E.S., Luo, Y., Gassmann, W., and Linn, S. (1996). Oxidative Damage to DNA Constituent by Iron-mediated Redox Reactions. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 21177–21186.

Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA Cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton Reactions Has Possible Biological Implications. *Journal of Biological Chemistry* 274, 962–971.

Hernas, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes: Pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 6, 225–242.

Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* 2, 189–194.

Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., and Gébrane-Younès, J. (2002). Emerging concepts of nucleolar assembly. *Journal of Cell Science* 115, 2265–2270.

Hindt, M.N., and Guerinot, M.L. (2012). Getting a sense for signals: Regulation of the plant iron deficiency response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1521–1530.

Hirata, A., Klein, B.J., and Murakami, K.S. (2008). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* 451, 851–854.

Honda, K., Smith, M.A., Zhu, X., Baus, D., Merrick, W.C., Tartakoff, A.M., Hattier, T., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Fujioka, H., et al. (2005). Ribosomal RNA in Alzheimer Disease Is Oxidized by Bound Redox-active Iron. *J. Biol. Chem.* 280, 20978–20986.

Hozak, P., Novak, J.T., and Smetana, K. (1989). Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biology of the Cell* 66, 225–233.

Hozák, P., Cook, P.R., Schöfer, C., Möslinger, W., and Wachtler, F. (1994). Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *Journal of Cell Science* 107, 639–648.

Hu, H., and Li, X. (2007). Transcriptional regulation in eukaryotic ribosomal protein genes. *Genomics* 90, 421–423.

Huang, S. (2000). Review: Perinucleolar Structures. *Journal of Structural Biology* 129, 233–240.

Huber, F.M., and Hoelz, A. (2017). Molecular basis for protection of ribosomal protein L4 from cellular degradation. *Nature Communications* 8, 1–10.

Imamura, S., Hanaoka, M., and Tanaka, K. (2008). The plant-specific TFIIB-related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I. *The EMBO Journal* 27, 2317–2327.

Jacob, M.D., Audas, T.E., Umaniacke, J., Trinkle-Mulcahy, L., and Lee, S. (2013). Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. *Molecular Biology of the Cell* 24, 2943–2953.

Jády, B., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H /ACA scaRNAs share a common Cajal body –specific localization signal. *The Journal of Cell Biology* 164, 647–652.

Jarboui, M.A., Bidoia, C., Woods, E., Roe, B., Wynne, K., Elia, G., Hall, W.W., and Gautier, V.W. (2012). Nucleolar Protein Trafficking in Response to HIV-1 Tat: Rewiring the Nucleolus. *PLoS ONE* 7, 1–17.

Jitsukawa, M., Kogure, H., Ogushi, S., and Miyano, T. (2012). Effects of Proteasome Inhibitors on the Nucleolar Size of Proximal Oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 58, 162–166.

Johnson, F.B., Marciniak, R.A., and Guarente, L. (1998). Telomeres, the nucleolus and aging. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 332–338.

Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., and Taliansky, M. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Response. *Frontiers in Plant Science* 9, 1–19.

Kallstrom, G., Hedges, J., and Johnson, A. (2003). The Putative GTPases Nog1p and Lsg1p Are Required for 60S Ribosomal Subunit Biogenesis and Are Localized to the Nucleus and Cytoplasm, Respectively. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4344–4355.

Kassavetis, G.A., Bartholomew, B., Blanco, J.A., Johnson, T.E., and Geiduschek, E.P. (1991). Two essential components of the Saccharomyces cerevisiae transcription factor TFIIH: Transcription and DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7308–7312.

Kato, A., Nakajima, T., Yamashita, J., Yakura, K., and Tanifugi, S. (1990). The structure of the large spacer region of the rDNA in *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Plant Molecular Biology* 14, 983–993.

Kim, Y.-K., Kim, S., Shin, Y., Hur, Y.-S., Kim, W.-Y., Lee, M.-S., Cheon, C.-I., and Verma, D.P.S. (2014). Ribosomal Protein S6, a Target of Rapamycin, Is Involved in the Regulation of rRNA Genes by Possible Epigenetic Changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 3901–3912.

Klatte, M., Schuler, M., Wirtz, M., Fink-Straube, C., Hell, R., and Bauer, P. (2009). The Analysis of *Arabidopsis* Nicotianamine Synthase Mutants Reveals Functions for Nicotianamine in Seed Iron Loading and Iron Deficiency Responses. *PLANT PHYSIOLOGY* 150, 257–271.

Knibiehler, B., Mirre, C., Navarro, A., and Rosset, R. (1984). Studies on chromatin organization in a nucleolus without fibrillar centres: Presence of a sub-nucleolar structure in KCo cells of *Drosophila*. *Cell and Tissue Research* 236, 279–288.

Knutson, B.A. (2013). Emergence and expansion of TFIIB-like factors in the plant kingdom. *Gene* 526, 30–38.

von Kobbe, C., and Böhr, V.A. (2002). A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949–1092. *Journal of Cell Science* 115, 3901–3907.

Koch, S., Garcia Gonzalez, O., Assfalg, R., Schelling, A., Schäfer, P., Scharffetter-Kochanek, K., and Iben, S. (2014). Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. *Cell Cycle* 13, 2029–2037.

Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Sáez-Vasquez, J., Echeverría, M., Nakagawa, T., et al. (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *The Plant Journal* 49, 1053–1063.

Kornprobst, M., Turk, M., Ellner, N., Cheng, J., Lemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2016). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* 166, 380–393.

Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 640–654.

Kumar, N., Rizek, P., and Jørg, M. (2016). Neuroferritinopathy: Pathophysiology, Presentation, Differential Diagnoses and Management. Tremor and Other Hyperkinetic Movements 1–10.

Kumar, R.K., Chu, H.-H., Abundis, C., Vasques, K., Rodriguez, D.C., Chia, J.-C., Huang, R., Vatamaniuk, O.K., and Walker, E.L. (2017). Iron-Nicotianamine Transporters Are Required for Proper Long Distance Iron Signaling. *Plant Physiology* 175, 1254–1268.

Kurepa, J., and Smalle, J.A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90, 324–335.

Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., and Smalle, J. (2009). Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 4, 924–927.

Lafarga, M., Berciano, M.T., Hervas, J.P., and Villegas, J. (1989). Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. *Journal of Neurocytology* 18, 19–26.

Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., and Andersen, J.S. (2007). Analysis of Nucleolar Protein Dynamics Reveals the Nuclear Degradation of Ribosomal Proteins. *Current Biology* 17, 749–760.

Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., and Gagliardi, D. (2008). Degradation of a Polyadenylated rRNA Maturation By-Product Involves One of the Three RRP6-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3038–3044.

Lange, H., Sement, F.M., and Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 68, 51–63.

Lange, H., Zuber, H., Sement, F.M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Brunaud, V., Bérard, C., Bouteiller, N., Balzergue, S., et al. (2014). The RNA Helicases AtMTR4 and HEN2 Target Specific Subsets of Nuclear Transcripts for Degradation by the Nuclear Exosome in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 10, 1–21.

Langst, G., Blaak, T.A., Becker, P.B., and Grummt, I. (1997). RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *The EMBO Journal* 16, 760–768.

Latonen, L., Moore, H.M., Bai, B., Jäämaa, S., and Laiho, M. (2011). Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* 30, 790–805.

Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S. (2004). A Concerted DNA Methylation/Histone Methylation Switch Regulates rRNA Gene Dosage Control and Nucleolar Dominance. *Molecular Cell* 13, 599–609.

Layat, E., Saez-Vasquez, J., and Tourmente, S. (2012). Regulation of Pol I-Transcribed 45S rDNA and Pol III-Transcribed 5S rDNA in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 53, 267–276.

Lee, K.-H., Minami, A., Marshall, R.S., Book, A.J., Farmer, L.M., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2011). The RPT2 Subunit of the 26S Proteasome Directs Complex Assembly, Histone Dynamics, and Gametophyte and Sporophyte Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23, 4298–4317.

Lefaki, M., Papaevgeniou, N., and Chondrogianni, N. (2017). Redox regulation of proteasome function. *Redox Biology* 13, 452–458.

Lempiäinen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 855–863.

Lempiäinen, H., and Shore, D. (2010). Erratum to: ‘Growth control and ribosome biogenesis’ [Curr. Opin. Cell Biol. 2009, 21:855–863]. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 555.

Leung, A.K.L., and Lamond, A.I. (2003). The Dynamics of the Nucleolus. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 13, 39–54.

Lewinska, A., Wnuk, M., Grzelak, A., and Bartosz, G. (2010). Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* 15, 87–96.

Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W.-L., Lagrange, T., Pikaard, C.S., and Jacobsen, S.E. (2006). A nucleolus-containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126, 93–106.

Liang, Y.M., Wang, X., Ramalingam, R., So, K.Y., Lam, Y.W., and Li, Z.F. (2012). Novel nucleolar isolation method reveals rapid response of human nucleolar proteomes to serum stimulation. *Journal of Proteomics* 77, 521–530.

Lijsebettens, M.V., Bauw, G., Villarroel, R., and Montagu, M.V. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis* PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. *The EMBO Journal* 13, 3378–3388.

Lin, Y.-M., Chu, P.-H., Li, Y.-Z., and Ouyang, P. (2017). Ribosomal protein pNO40 mediates nucleolar sequestration of SR family splicing factors and its overexpression impairs mRNA metabolism. *Cellular Signalling* 32, 12–23.

Ma, T.-H., Lee, L.-W., Lee, C.-C., Yi, Y.-H., Chan, S.-P., Tan, B.C.-M., and Lo, S.J. (2016). Genetic control of nucleolar size: An evolutionary perspective. *Nucleus* 7, 112–120.

Madru, C., Lebaron, S., Blaud, M., Delbos, L., Pipoli, J., Pasmant, E., Réty, S., and Leulliot, N. (2015). Chaperoning 5S RNA assembly. *Genes & Development* 29, 1432–1446.

Maniaci, C., Hughes, S.J., Testa, A., Chen, W., Lamont, D.J., Rocha, S., Alessi, D.R., Romeo, R., and Ciulli, A. (2017). Homo-PROTACs: bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation. *Nature Communications* 8.

Marciniak, R .A., Lombard, D.B., Johnson, F .B., a nd Guarente, L. (1998). N ucleolar localization of the Werner syndrome pr otein i n hum an c ells. P roceedings of t he N ational Academy of Sciences 95, 6887–6892.

Martins, L., T rujillo-Hernandez, J .A., a nd R eichheld, J .-P. (2018). Thiol B ased R edox Signaling in Plant Nucleus. *Frontiers in Plant Science* 9, 1–9.

Mathieu, O ., Jasencakova, Z ., V aillant, I ., G endrel, A .-V ., C olot, V ., S chubert, I ., a nd Tourmente, S . (2003). C hanges i n 5S r DNA C hromatin O rganization a nd T ranscription during H eterochromatin E stablishment i n A rabidopsis. T HE PLANT CELL ONLINE 15, 2929–2939.

Matsumura, Y ., Ohbayashi, I ., Takahashi, H ., Kojima, S ., Ishibashi, N ., Keta, S ., Nakagawa, A ., H ayashi, R ., S aéz-Vásquez, J ., E cheverria, M ., et al. (2016). A ge netic l ink between epigenetic r epressor A S1-AS2 and a put ative sm all sub unit p rocessome i n leaf pol arity establishment of *Arabidopsis*. *Biology Open* 5, 942–954.

Mattsson, K ., Pokrovskaja, K ., Kiss, C ., Klein, G ., and Szekely, L. (2000). Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome- dependent protein degradation. P NAS 98, 1012–1017.

McClintock, B. (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. *Z. f. Zellforschung u. Mikr. Anatomie* 21, 294–326.

McStay, B ., and Grummt, I . (2008). T he E pigenetics of r RNA G enes: F rom M olecular t o Chromosome Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 131–157.

Mekhail, K ., Khacho, M ., Carrigan, A ., Hache, R.R.J ., Gunaratnam, L ., and Lee, S . (2005). Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *The Journal of Cell Biology* 170, 733–744.

Melnikov, S ., Ben-Shem, A ., G arreau de L oubresse, N ., Jenner, L ., Yusupova, G ., a nd Yusupov, M . (2012). O ne c ore, t wo s halls: ba cterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 560–567.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 6422–6427.

Micol-Ponce, R., Sarmiento-Manus, R., Ruiz-Bayón, A., Montacié, C., Saez-Vasquez, J., and Ponce, M.R. (2018). Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 is required for 18S rRNA maturation. *The Plant Cell* *30*, 2855–2872.

Miller, O.L.J., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of Nucleolar Genes. *Science* *164*, 955–957.

Mohannath, G., Pontvianne, F., and Pikaard, C.S. (2016). Selective nucleolus organizer inactivation in *Arabidopsis* is a chromosome position-effect phenomenon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 13426–13431.

Montacié, C., Durut, N., Opsomer, A., Palm, D., Comella, P., Picart, C., Carpentier, M.-C., Pontvianne, F., Carapito, C., Schleiff, E., et al. (2017). Nucleolar Proteome Analysis and Proteasomal Activity Assays Reveal a Link between Nucleolus and 26S Proteasome in *A. thaliana*. *Frontiers in Plant Science* *8*, 1–13.

Montgomery, T.S.H. (1898). Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *Journal of Morphology* *15*, 265–582.

Mori, S. (1999). Iron acquisition in plants. *Current Opinion in Plant Biology* *2*, 250–253.

Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Current Opinion in Genetics & Development* *14*, 210–217.

Murata, Y., Itoh, Y., Iwashita, T., and Namba, K. (2015). Transgenic Petunia with the Iron(III)-Phytosiderophore Transporter Gene Acquires Tolerance to Iron Deficiency in Alkaline Environments. *PLOS ONE* *10*, 1–15.

Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., et al. (2008). Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. *Cell* *133*, 627–639.

Nagy, E., Eaton, J.W., Jeney, V., Soares, M.P., Varga, Z., Galajda, Z., Szentmiklosi, J., Mehes, G., Csonka, T., Smith, A., et al. (2010). Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron, and Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *30*, 1347–1353.

Nakagawa, T., and Nakayama, K. (2015). Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes to Cells* *20*, 543–562.

Nalabothula, N., Indig, F.E., and Carrier, F. (2010). The Nucleolus Takes Control of Protein Trafficking Under Cellular Stress. *Mol Cell Pharmacol* *2*, 203–212.

Németh, A., and Grummt, I. (2018). Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Current Opinion in Cell Biology* *52*, 105–111.

Németh, A., and Längst, G. (2011). Genome organization in and around the nucleolus. *Trends in Genetics* *27*, 149–156.

Nigg, E.A. (1990). Mechanisms of Signal Transduction to the Cell Nucleus. Advances in Cancer Research 55, 271–310.

O'Donohue, M.-F., Choesmel, V., Faubladier, M., Fichant, G., and Gleizes, P.-E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. The Journal of Cell Biology 190, 853–866.

Ohbayashi, I., and Sugiyama, M. (2018). Plant Nucleolar Stress Response, a New Face in the NAC-Dependent Cellular Stress Responses. Frontiers in Plant Science 8, 1–8.

Ohbayashi, I., Lin, C.-Y., Shinohara, N., Matsumura, Y., Machida, Y., Horiguchi, G., Tsukaya, H., and Sugiyama, M. (2017). Evidence for a Role of ANAC082 as a Ribosomal Stress Response Mediator Leading to Growth Effects and Developmental Alterations in *Arabidopsis*. The Plant Cell 29, 2644–2660.

Olson, M.O.J., and Dundr, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. Histochemistry and Cell Biology 123, 203–216.

Padeken, J., and Huen, P. (2014). Nucleolus and nucleolar periphery: A landscape of heterochromatin. Current Opinion in Cell Biology 28, 54–60.

Palm, D., Simm, S., Darm, K., Weis, B.L., Ruprecht, M., Schleiff, E., and Scharf, C. (2016). Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. RNA Biology 13, 441–454.

Palm, D., Streit, D., Ruprecht, M., Simm, S., Scharf, C., and Schleiff, E. (2018). Late ribosomal protein localization in *Arabidopsis thaliana* differs to that in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Open Bio 8, 1437–1444.

Parks, M.M., Kurylo, C.M., Dass, R.A., Bojmar, L., Lyden, D., Vincent, C.T., and Blanchard, S.C. (2018). Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. Science Advances 4, 1–13.

Parlato, R., Bierhoff, H., and Institute of Applied Physiology, University of Ulm, Ulm, Germany; (2015). Role of nucleolar dysfunction in neurodegenerative disorders: a game of genes? AIMS Molecular Science 2, 211–224.

Paule, M.R., and White, R.J. (2000). SURVEY AND SUMMARY Transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Research 28, 1283–1298.

Pavlišová, V., Dvořáčková, M., Jež, M., Mozgová, I., Mokroš, P., and Fajkus, J. (2016). Phenotypic reversion in fas mutants of *Arabidopsis thaliana* by reintroduction of FAS genes: variable recovery of telomeres with major spatial arrangements and transcriptional reprogramming of 45S rDNA genes. The Plant Journal 88, 411–424.

Pébusque, M.-J., and Seite, R. (1981). ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF SILVER-STAINED PROTEINS IN NUCLEAR ORGANIZER REGIONS: LOCATION IN NUCLEOLI OF RAT SYMPATHETIC NEURONS DURING LIGHT AND DARK PERIODS. Journal of Cell Science 51, 85–94.

Pederson, T. (2011). The Nucleolus. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3, 1–15.

Pederson, T., and Politz, J.C. (2000). The Nucleolus and the Four Ribonucleoproteins of Translation. *The Journal of Cell Biology* *148*, 1091–1096.

Peifer, C., Sharma, S., Watzinger, P., Lamberth, S., Kötter, P., and Entian, K.-D. (2013). Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Research* *41*, 1151–1163.

Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W.S., and Shaw, P.J. (2005). Proteomic Analysis of the Arabidopsis Nucleolus Suggests Novel Nucleolar Functions. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 10.

Peng, C.I., Mannuss, A., Orel, N., Heitzeberg, F., and Puchta, H. (2008). A Homolog of ScRAD5 Is Involved in DNA Repair and Homologous Recombination in Arabidopsis. *Plant Physiology* *146*, 1786–1796.

Phipps, K.R., Charette, J.M., and Baserga, S.J. (2011). The small subunit pre-assembly in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* *2*, 1–21.

Pietrzak, M., Empala, G., Nelson, P.T., Zheng, J.-J., and Hetman, M. (2011). Epigenetic Silencing of Nucleolar rRNA Genes in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* *6*, 1–10.

Pikaard, C.S. (2002). Transcription and Termination in the Nucleolus: The Organization, Activation, Dominance and Repression of Ribosomal RNA Genes. *The Arabidopsis Book* *1*, 1–23.

Pillet, B., Mitterer, V., Kressler, D., and Pertschy, B. (2017). Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins: Dedicated chaperones mediate the safe transfer of ribosomal proteins to their site of pre-ribosome incorporation. *BioEssays* *39*, 1–12.

Politz, J.C.R., Polena, I., Task, I., Bazzett-Jones, D.P., and Pederson, T. (2005). A Nonribosomal Landscape in the Nucleolus Revealed by the Stem Cell Protein Nucleostemin. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 3401–3410.

Pollock, C., and Huang, S. (2010). The Perinucleolar Compartment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *2*, 1–10.

Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E., and Pikaard, C.S. (2006). The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell* *126*, 79–92.

Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., and Saez-Vasquez, J. (2007). Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell* *18*, 369–379.

Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., DeBures, A., Blelloch, T., Cooke, R., Medina, F.J., et al. (2010). Nucleolin Is Required for DNA Methylation State and the Expression of rRNA Gene Variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* *6*, 1–13.

Pontvianne, F., Carpentier, M.-C., Durut, N., Pavlištová, V., Jaške, K., Schořová, Š., Parrinello, H., Rohmer, M., Pikaard, C.S., Fojtová, M., et al. (2016a). Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals the role of the nucleolus in the 3D organisation of the *A. thaliana* genome. *Howard Hughes Medical Institute - Cell Rep.* *16*, 1574–1587.

Pontvianne, F., Boyer-Clavel, M., and Sáez-Vásquez, J. (2016b). Fluorescence-Activated Nucleolus Sorting in *Arabidopsis*. In *The Nucleolus: Methods and Protocols*, A. Németh, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 203–211.

Powell, K. (2015). Thoru Pederson: Spotting novel roles for the nucleolus. *J Cell Biol* *208*, 384–385.

Preuss, S.B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R.J., Mosher, R., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Baulcombe, D.C., Viegas, W., et al. (2008). Multimegapbase Silencing in Nucleolar Dominance Involves si RNA-Directed DNA Methylation and Specific Methylcytosine-Binding Proteins. *Molecular Cell* *32*, 673–684.

Puvion-Dutilleul, F., Bernadac, A., Puvion, E., and Bernhard, W. (1977). Visualization of two different types of nuclear transcriptional complexes in rat liver cells. *Journal of Ultrastructure Research* *58*, 108–117.

Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J.Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., and Patiño, C. (2006). Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *Journal of Structural Biology* *153*, 42–54.

Rabanal, F.A., Mandáková, T., Soto-Jiménez, L.M., Greenhalgh, R., Parrott, D.L., Lutzmayer, S., Steffen, J.G., Nizhynska, V., Mott, R., Lysak, M.A., et al. (2017a). Epistatic and allelic interactions control expression of ribosomal RNA genes clusters in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* *18*, 1–15.

Rabanal, F.A., Nizhynska, V., Mandáková, T., Novikova, P.Y., Lysak, M.A., Mott, R., and Nordborg, M. (2017b). Unstable Inheritance of 45S rRNA Genes in *Arabidopsis thaliana*. *G3: Genes / Genomes / Genetics* *7*, 1201–1209.

Raška, I., Koberna, K., Malínský, J., Fidlerová, H., and Mašata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell* *96*, 579–594.

Raška, I., Shaw, P.J., and Čmarko, D. (2006a). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biology* *18*, 325–334.

Raška, I., Shaw, P.J., and Čmarko, D. (2006b). New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. *International Review of Cytology* *255*, 177–235.

Rattner, J.B., Saunders, C., Davie, J.R., and Hamkalo, B.A. (1982). Ultrastructural organization of yeast chromatin. *The Journal of Cell Biology* *93*, 217–222.

Ream, T.S., Haag, J.R., Pontvianne, F., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Paša-Tolić, L., and Pikaard, C.S. (2015). Subunit compositions of *Arabidopsis* RNA polymerases I and III reveal Pol I- and Pol III-specific forms of the A40 subunit and alternative forms of the C53 subunit. *Nucleic Acids Research* *43*, 4163–4178.

- Reeder, R .H. (1998). R egulation of R NA Polymerase I T ranscription in Yeast a nd Vertebrates. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 62, 293–327.
- Regad, F ., L ebas, M ., and L escure, B . (1994). I nterstitial T elomeric R epeats w ithin the *Arabidopsis thaliana* Genome. *Journal of Molecular Biology* 239, 163–169.
- Reja, R ., Vinayachandran, V ., Ghosh, S ., and Pugh, B.F. (2015). Molecular mechanisms of ribosomal protein gene coregulation. *Genes Dev.* 29, 1942–1954.
- Ren, M ., Qiu, S ., Venglat, P ., Xiang, D ., Feng, L ., Selvaraj, G ., and Datla, R . (2011). Target of R apamycin R egulates D evelopment a nd Ribosomal RNA E xpression t hrough K inase Domain in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* 155, 1367–1382.
- Reyt, G ., Boudouf, S ., Boucherez, J ., Gaymard, F ., and Briat, J.-F. (2015). Iron- and Ferritin-Dependent R eactive O xygen S pecies D istribution: Impact on A rabidopsis R oot S ystem Architecture. *Molecular Plant* 8, 439–453.
- Ritossa, F.M., and Spiegelman, S . (1965). Localization of DNA complementary to Ribosomal RNA i n the N ucleolus Organizer R egion of D rosophila Melanogaster. *P roceedings of the National Academy of Sciences* 53, 737–745.
- Rodríguez-Celma, J ., Pan, I.-C ., Li, W ., Lan, P ., Buckhout, T ., and Schmidt, W . (2013). The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Frontiers in Plant Science* 4, 276.
- Rodríguez-Celma, J ., Pan, I.C ., Li, W ., Lan, P ., Buckhout, T.J ., and Schmidt, W . (2013). The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–10.
- Roschzttardtz, H ., Grillet, L ., Isaure, M.-P ., Conéjero, G ., Ortega, R ., Curie, C ., and Mari, S . (2011). Plant Cell N ucleolus a s a Hot S pot for Iron. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27863–27866.
- Roschzttardtz, H ., Conéjero, G ., Divol, F ., Alcon, C ., Verdeil, J.-L ., Curie, C ., and Mari, S . (2013). New insights into Fe localization in plant tissues. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–11.
- Sáez-Vásquez, J ., and Gadal, O . (2010). Genome Organization and Function: A View from Yeast and *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 3, 678–690.
- Sáez-Vásquez, J ., a nd Medina, F .J . (2008). T he P lant N ucleolus. A dvances in Botanical Research 47, 1–46.
- Saez-Vasquez, J ., a nd P ikaard, C.S. (1997). E xtensive pur ification of a put ative R NA polymerase I holoenzyme f rom pl ants t hat a ccurately initiates rR NA ge ne tra nscription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11869–11874.
- Saez-Vasquez, J ., a nd P ikaard, C.S. (2000). R NA P olymerase I Holoenzyme-Promoter Interactions. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37173–37180.
- Saez-Vasquez, J ., Meissner, M ., and P ikaard, C.S. (2001). RNA polymerase I holoenzyme–promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Molecular Biology* 47, 449–459.

Saez-Vasquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., and Echeverria, M. (2004). A Plant snoRNP Complex Containing snoRNAs, Fibrillarin, and Nucleolin-Like Proteins Is Competent for both rRNA Gene Binding and Pre-rRNA Processing In Vitro. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7284–7297.

Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M., and Fujiwara, T. (2011). *Arabidopsis thaliana* 26S Proteasome Subunits RPT2a and RPT5a Are Crucial for Zinc Deficiency-Tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 561–567.

Sako, K., Yanagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., Seki, M., Fujiwara, M., Fukao, Y., and Yamaguchi, J. (2014). Proteomic Analysis of the 26S Proteasome Reveals Its Direct Interaction with Transit Peptides of Plastid Protein Precursors for Their Degradation. *Journal of Proteome Research* 13, 3223–3230.

Samaha, H., Delorme, V., Ponthierville, F., Cooke, R., Delalande, F., Dorsellaer, A.V., Echeverria, M., and Sáez-Vásquez, J. (2010). Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a *Brassica oleracea* RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *The Plant Journal* 61, 383–398.

Schmidke, I., and Stephan, U.W. (1995). Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 95, 147–153.

Schmidke, I., Krüger, C., Frömmichen, R., Scholz, G., and Stephan, U.W. (1999). Phloem loading and transport characteristics of iron in interaction with plant-endogenous ligands in castor bean seedlings. *Physiologia Plantarum* 106, 82–89.

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

Setzer, D.R., and Brown, D.D. (1985). Formation and Stability of the 5S RNA Transcription Complex. *Journal of Biological Chemistry* 250, 2483–2492.

Sharma, S., and Lafontaine, D.L.J. (2015). ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 560–575.

Shaw, P.J. (2015). Nucleolus. In ELS, John Wiley & Sons Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–11.

Shaw, P.J., and Jordan, E.G. (1995). The Nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93–121.

Shaw, P.J., Abranches, R., Santos, A.P., Beven, A.F., Stoger, E., Wegel, E., and Gonzalez-Melendi, P. (2002). The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants. *Journal of Structural Biology* 140, 31–38.

Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., and Barna, M. (2017). Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Molecular Cell* 67, 71–83.

Sikorski, P.J., Zuber, H., Philippe, L., Sement, F.M., Canaday, J., Kufel, J., Gagliardi, D., and Lange, H. (2015). Distinct 18S rRNA precursors are targets of the exosome complex, the exoribonuclease RP6L2 and the terminal nucleotidyltransferase TRL in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 83, 991–1004.

Simon, L. (2016). Organisation, variabilité et contrôle épigénétique des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*. Université Blaise Pascal.

Simon, L., Rabanal, F.A., Dubois, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., Vogt, A., Mandlbauer, A., Le Goff, S., Sommer, A., et al. (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* *46*, 3019–3033.

Sinclair, D.A., Mills, K., and Gaurante, L. (1997). Accelerated Aging and Nucleolar Fragmentation in Yeast sgs1 Mutants. *Science* *277*, 1313–1316.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology* *129*, 13–31.

Sloan, K.E., Warda, A.S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D.L.J., and Bohnsack, M.T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology* *14*, 1138–1152.

Sogo, J.M., and Thoma, F. (2004). The structure of rDNA chromatin. In *The Nucleolus*, (Mark O.J. Olson), pp. 73–87.

Sørensen, P.D., and Frederiksen, S. (1991). Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* *19*, 4147–4151.

Srivastava, R., Srivastava, R., and Ahn, S.H. (2016). The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *80*, 545–563.

Stavreva, D.A., Kawasaki, M., Dundr, M., Koberna, K., Muller, W.G., Tsujimura-Takahashi, T., Komatsu, W., Hayano, T., Isobe, T., Raska, I., et al. (2006). Potential Roles for Ubiquitin and the Proteasome during Ribosome Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 5131–5145.

Stępiński, D. (2012a). Immunofluorescent localization of ubiquitin and proteasomes in nucleolar vacuoles of soybean root meristematic cells. *European Journal of Histochemistry* *56*, 71–77.

Stępiński, D. (2012b). Levels of DNA methylation and histone methylation and acetylation change in root tip cells of soybean seedlings grown at different temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* *61*, 9–17.

Stępiński, D. (2013). Nucleolar chromatin organization at different activities of soybean root meristematic cell nucleoli. *Protoplasma* *250*, 723–730.

Stępiński, D. (2014). Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* *251*, 1285–1306.

Sung, M.-K., Porras-Yakushi, T.R., Reitsma, J.M., Huber, F.M., Sweredoski, M.J., Hoelz, A., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016a). A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *ELife* *5*, 1–28.

Sung, M.-K., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016b). Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin–proteasome system. *Molecular Biology of the Cell* 27, 2642–2652.

Sylvester, J.E., Gonzalez, I.L., and Mougey, E.B. (2004). Structure and organization of vertebrate ribosomal DNA. In *The Nucleolus*, (Mark O.J. Olson), pp. 58–72.

Szekely, A.M., Chen, Y.-H., Zhang, C., Oshima, J., and Weissman, S.M. (2000). Werner protein recruits DNA polymerase δ to the nucleolus. *PNAS* 97, 11365–11370.

Tang, K., Lang, Z., Zhang, H., and Zhu, J.-K. (2016). The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. *Nature Plants* 2, 1–20.

Tchelidze, P., Benassarou, A., Kapan, H., O'Donohue, M.-F., Lucas, L., Terryn, C., Rusishvili, L., Mosidze, G., Lalun, N., and Ploton, D. (2017). Nucleolar sub-compartments in motion during rRNA synthesis inhibition: Contraction of nucleolar condensed chromatin and gathering of fibrillar centers are concomitant. *PLOS ONE* 12, 1–37.

Teissere, M., Penon, P., Van Huystee, R.B., Azou, Y., and Ricaud, J. (1975). Hormonal control of transcription in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 402, 391–402.

Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. (2014a). Glutamine methylation in Histone H2A is an RNA Polymerase I dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.

Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. (2014b). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.

Thiry, M., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in Cell Biology* 15, 194–199.

Thiry, M., Schoonbroodt, S., and Goessens, G. (1991). Cytochemical distinction of various nucleolar components in insect cells. *Biology of the Cell* 72, 133–140.

Tomecki, R., Sikorski, P.J., and Zakrzewska-Placzek, M. (2017). Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Letters* 591, 1801–1850.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell Cycle-regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres. *Molecular Biology of the Cell* 17, 955–965.

Tremousaygue, D., Laudie, M., Grellet, F., and Delseny, M. (1992). The *Brassica oleracea* rDNA spacer revisited. *Plant Molecular Biology* 18, 1013–1018.

Trémousaygue, D., Garnier, L., Barde, C., Dabos, P., Hervé, C., and Lescure, B. (2003). Internal telomeric repeats and ‘TCP domain’ protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *The Plant Journal* 33, 957–966.

Tsai, R.Y.L., and Pederson, T. (2014). Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *The FASEB Journal* 28, 3290–3296.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology* 13, 255–263.

Ueki, M., Uchizawa, E., and Yakuwa, K. (1992). The nucleotide sequence of the rDNA intergenic spacer region in a wild species of the genus *Vicia*, *V. angustifolia*. *Plant Molecular Biology* 18, 175–178.

Upadhyay, B., Lahudkar, S., M. Alik, S., and Bhaumik, S.R. (2012). The 19S proteasome subcomplex promotes the targeting of NuA4 HAT to the promoters of ribosomal protein genes to facilitate the recruitment of TF IID for transcriptional initiation in vivo. *Nucleic Acids Research* 40, 1969–1983.

Vaillant, I., Tutois, S., Jasencakova, Z., Doutet, J., Schubert, I., and Tourmente, S. (2008). Hypomethylation and hypermethylation of tandem repetitive 5 S rRNA genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 54, 299–309.

Valentin, G. (1836). *Repertorium für Anatomie und Physiologie*. Verlag von Veit Und Comp 1–293.

Vierstra, R. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8, 135–142.

Wang, J., Lan, P., Gao, H., Zheng, L., Li, W., and Schmidt, W. (2013). Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient *Arabidopsis* roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. *BMC Genomics* 14, 1–14.

Wang, X., Li, Q., Yuan, W., Cao, Z., Qi, B., Kumar, S., Li, Y., and Qian, W. (2016). The cytosolic Fe-S cluster assembly component MET18 is required for the full enzymatic activity of ROS1 in active DNA demethylation. *Scientific Reports* 6, 1–15.

Waterworth, W.M., Drury, G.E., Blundell-Hunter, G., and West, C.E. (2015). *Arabidopsis* TAF1 is an MRE11-interacting protein required for resistance to genotoxic stress and viability of the male gametophyte. *The Plant Journal* 84, 545–557.

Watkins, N.J., and Bohnsack, M.T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA: Box C/D and H/ACA snoRNPs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3, 397–414.

Weber, S.C., and Brangwynne, C.P. (2015). Inverse Size Scaling of the Nucleolus by a Concentration-Dependent Phase Transition. *Current Biology* 25, 641–646.

Weis, B.L., Missbach, S., Marzi, J., Bohnsack, M.T., and Schleiff, E. (2014). The 60S associated ribosome biogenesis factor LSG1-2 is required for 40S maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 80, 1043–1056.

Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., and Schleiff, E. (2015a). Plant-Specific Features of Ribosome Biogenesis. *Trends in Plant Science* 20, 729–740.

Weis, B.L., Palm, D., Missbach, S., Bohnsack, M.T., and Schleiff, E. (2015b). atBRX1-1 and atBRX1-2 are involved in an alternative rRNA processing pathway in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 21, 415–425.

White, M.D., and Flashman, E. (2016). Catalytic strategies of the non-heme iron dependent oxygenases and their roles in plant biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 31, 126–135.

Willi, J., Küpfer, P., Evéquoz, D., Fernandez, G., Katz, A., Leumann, C., and Polacek, N. (2018). Oxidative stress damages rRNA inside the ribosome and differentially affects the catalytic center. *Nucleic Acids Research* 46, 1945–1957.

Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643–681.

Xie, W., Ling, T., Zhou, Y., Feng, W., Zhu, Q., Stunnenberg, H.G., Grummt, I., and Tao, W. (2012). The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8161–8166.

Xiong, Y., and Sheen, J. (2014). The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *PLANT PHYSIOLOGY* 164, 499–512.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496, 181–186.

Yakura, K., and Nishikawa, K. (1992). The nucleotide sequence of the rDNA spacer region between the 25S and 18S rRNA genes in a species of the genus *Vicia*, *V. hispida*. *Plant Molecular Biology* 19, 537–539.

Yang, L., Song, T., Chen, L., Kabra, N., Zheng, H., Koomen, J., Seto, E., and Chen, J. (2013). Regulation of SirT1-Nucleomethylin Binding by rRNA Coordinates Ribosome Biogenesis with Nutrient Availability. *Molecular and Cellular Biology* 33, 3835–3848.

Yano, H., and Sato, S. (2002). Combination of electron microscopic in situ hybridization and anti-DNA antibody labelling reveals a peculiar arrangement of ribosomal DNA in the fibrillar centres of the plant cell nucleolus. *Journal of Electron Microscopy* 51, 231–239.

Yarunin, A., Pansen, V., Górecki, E., Dęż, C., Tollervey, D., and Hurt, E. (2005). Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO Journal* 24, 580–588.

Yu, H., Yang, J., Shi, Y., Donelson, J., Thompson, S.M., Sprague, S., Roshan, T., Wang, D.-L., Liu, J., Park, S., et al. (2017). Arabidopsis Glutaredoxin S17 Contributes to Vegetative Growth, Mineral Accumulation, and Redox Balance during Iron Deficiency. *Frontiers in Plant Science* 8, 1–11.

Yuan, H.-M., Liu, W.-C., and Lu, Y.-T. (2017). CATALASE2 Coordinates SA-Mediated Repression of Both Auxin Accumulation and JA Biosynthesis in Plant Defenses. *Cell Host & Microbe* 21, 143–155.

Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., and Zhou, Y. (2007). Activation of RNA Polymerase I Transcription by Cockayne Syndrome Group B Protein and Histone Methyltransferase G9a. *Molecular Cell* 27, 585–595.

Zhai, Z., Gayomba, S.R., Jung, H.-i., Vimalakumari, N.K., Pineros, M., Craft, E., Rutzke, M.A., Danko, J., Lahner, B., Punshon, T., et al. (2014). OPT3 Is a Phloem-Specific Iron Transporter That Is Essential for Systemic Iron Signaling and Redistribution of Iron and Cadmium in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26, 2249–2264.

Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: Ribosomal Proteins Find Their Way. *Cancer Cell* 16, 369–377.

Zhang, C., Guo, H., Zhang, J., Guo, G., Schumaker, K.S., and Guo, Y. (2010). Arabidopsis Cockayne Syndrome A-Like Proteins 1A and 1B Form a Complex with CULLIN4 and Damage DNA Binding Protein 1A and Regulate the Response to UV Irradiation. *THE PLANT CELL ONLINE* 22, 2353–2369.

Zhang, H., Jiang, Z., Qin, R., Zhang, H., Zou, J., Jiang, W., and Liu, D. (2014). Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology* 14.

Zhou, X., Liao, W.-J., Liao, J.-M., Liao, P., and Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology* 7, 92–104.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell* 15, 81–90.

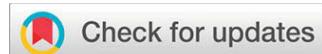
ANNEXES

Les deux Annexes ci-après sont des articles (publié et en préparation) issus d'une collaboration avec l'équipe de María Rosa Ponce (Elche, Espagne). Ces articles portent sur la caractérisation des mutants *rrp7* et *smo4*. Les protéines RRP7 et SMO4 sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes et ont été identifiées dans notre protéome nucléolaire.

Ma participation dans ces articles a été la mise au point de la méthode de séparation des polysomes et monosomes par gradient de sucre.

Annexe 1 : Article publié dans The Plant Cell :

**“*Arabidopsis* RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 Is Required for
18S rRNA Maturation”**



Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 Is Required for 18S rRNA Maturation

Rosa Micol-Ponce,^a Raquel Sarmiento-Mañús,^a Alejandro Ruiz-Bayón,^a Charlotte Montacié,^{b,c}
Julio Sáez-Vasquez,^{b,c} and María Rosa Ponce^{a,1}

^a Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.

^b Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, 66860, Perpignan, France.

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

ORCID IDs: 0000-0001-9389-2906 (R.M.-P.); 0000-0001-6929-8034 (R.S.-M.); 0000-0002-3533-8269 (A.R.-B.); 0000-0003-3610-6870 (C.M.); 0000-0002-2717-7995 (J.S.-V.); 0000-0003-0770-4230 (M.R.P.)

Ribosome biogenesis is fundamental to growth and development in eukaryotes and is linked to human diseases and cancer. *Arabidopsis thaliana* MORPHOLOGY OF ARGONAUTE1-52 SUPPRESSED 2 (*MAS2*) participates in splicing and 45S ribosomal DNA (rDNA) expression. In a screen for *MAS2* interactors, we identified RIBOSOMAL RNA PROCESSING 7 (*RRP7*), an ortholog of yeast rRNA processing protein 7 (*Rrp7*), which is required for 18S ribosomal RNA (rRNA) maturation. *Arabidopsis rrp7* mutants exhibit a pleiotropic phenotype including slow growth, altered shoot phyllotaxy, aberrant venation in lateral organs, partial infertility, and abscisic acid hypersensitivity in seedlings. In *Arabidopsis*, *RRP7* localizes mainly to the nucleolus, the site of the 45S rDNA transcription that produces a 45S pre-rRNA primary transcript, precursor of the 25S, 18S and 5.8S rRNAs. Lack of *RRP7* function perturbs 18S rRNA maturation, causes nucleolar hypertrophy, and results in an increased 25S/18S rRNA ratio. *Arabidopsis* contains hundreds of 45S rDNA genes whose expression is epigenetically regulated, and deregulated, in *rrp7* mutants. Double mutant analysis revealed synergistic interactions between *RRP7* alleles and alleles of *MAS2*, *NUCLEOLIN1* (*NUC1*), and *HISTONE DEACETYLASE 6* (*HDA6*), which encode epigenetic regulators of 45S rDNA transcription. Our results reveal the evolutionarily conserved but divergent roles of *RRP7* as a ribosome biogenesis factor.

INTRODUCTION

The ribosome is a molecular machine that originated 3 to 4 billion years ago. It translates mRNAs (mRNAs) into proteins in a process universal to all life forms (Petrov et al., 2014). In eukaryotic cells, cytoplasmic, mitochondrial, and chloroplast ribosomes are composed of a large subunit (LSU) and a small subunit (SSU), each consisting of 1 to 3 rRNAs (rRNAs) and tens of ribosomal proteins (RPs) (Wilson and Doudna Cate, 2012). For example, the eukaryotic cytoplasmic (80S) ribosome is composed of ~80 RPs and four rRNAs, which include one 28S/25S rRNA (28S in metazoans, and 25S in plants and yeast), together with 18S, 5.8S, and 5S rRNAs.

The 28S/25S, 18S, and 5.8S rRNAs are the final products of the transcription and complex processing of a single polycistronic precursor, the 47S/45S/35S pre-rRNA (47S in metazoans, 45S in plants, and 35S in yeast; Henras et al., 2015; Lafontaine, 2015). The 47S/45S/35S rDNA genes are transcribed by RNA polymerase I (RNA Pol I) in the nucleolus, resulting in a single 47S/45S/35S pre-rRNA, which undergoes chemical modifications, endonucleolytic cleavages, and exonucleolytic trimmings to render

mature 28S/25S, 18S, and 5.8S rRNAs (Supplemental Figures 1 and 2).

Biogenesis of the 80S ribosome begins with the transcription of the 47S/45S/35S rDNA genes and processing of their primary transcripts to render mature 28S/25S, 18S, and 5.8S rRNAs. The SSU and LSU are assembled in the nucleus and exported to the cytoplasm in almost completely mature form. The 40S subunit contains the 18S rRNA and ~33 RPs, whereas the 60S subunit contains the 28S/25S, 5.8S, and 5S rRNAs, and ~47 RPs (Weis et al., 2015). The final eukaryotic 80S ribosome is assembled in the cytoplasm from a 40S SSU and a 60S LSU.

Work on the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 80S ribosome has elucidated its composition, architecture, action, and the interactions of its components (Woolford and Baserga, 2013; Chaker-Margot et al., 2017). Much of the assembly and maturation of the yeast 40S ribosomal subunit is performed by a large ribonucleoprotein complex termed the SSU processome or 90S preribosomal particle (Phipps et al., 2011). The SSU processome is cotranscriptionally assembled during transcription of the 35S rDNA by the stepwise recruitment of ribosome biogenesis factors (RBFs). Many of these RBFs assemble as subcomplexes prior to their incorporation into the SSU processome. Some subcomplexes are small nucleolar ribonucleoprotein particles (snoRNPs) that include a snoRNA that is partially complementary to different regions of the 35S pre-rRNA. The snoRNAs guide site-specific cleavages, ribose 2'-O-methylation (box C/D family snoRNAs), and uridine-to-pseudouridine conversions (box H/ACA snoRNAs) (Kiss et al., 2002).

¹ Address correspondence to mrponce@umh.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: María Rosa Ponce (mrponce@umh.es)
www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.18.00245

IN A NUTSHELL

Background: The ancient, universal molecular machine for protein synthesis is the ribosome, which is composed of ribosomal proteins (RPs) and rRNAs. Ribosome biogenesis is a process conserved in all eukaryotes, with divergent aspects among fungi, plants, and animals. In plants, processing of 45S pre-rRNA (the primary transcript of 45S rDNA genes) produces the 25S, 18S, and 5.8S rRNAs. Maturation of these rRNAs is a complex, multistep process involving several alternative pathways and many ribosome biogenesis factors (RBFs), some with known enzymatic activity. Putative RBFs have been identified in plants by homology with those in fungi and mammals, but experimental evidence of their functions is available for only some of these putative RBFs. Ribosomal processing protein 7 (Rrp7) is a demonstrated yeast RBF; its likely *Arabidopsis* ortholog, which we dubbed RIBOSOMAL PROCESSING PROTEIN 7 (RRP7), is encoded by the AT5G38720 gene.

Questions: What are the action and interactions of *Arabidopsis* RRP7? What roles does it play as a RBF? Are these roles—including the steps of ribosome biogenesis in which RRP7 acts—conserved or divergent with those of yeast Rrp7?

Findings: By means of genetic and molecular approaches, we found that RRP7 is both evolutionarily conserved and divergent. Similar to its yeast and human homologs, *Arabidopsis* RRP7 is involved in 18S rRNA maturation. However, unlike yeast Rrp7, it is not an essential factor. Loss of RRP7 function causes nucleolar hypertrophy and defects in 18S rRNA maturation. These molecular phenotypes of the *rrp7* mutants are associated with pleiotropic developmental defects, indicating that RRP7 is required for normal plant growth and fertility. RRP7 is localized at the nucleolus and the nucleolar periphery. We genetically combined mutant alleles of *RRP7* and mutant alleles of genes that are known to encode epigenetic regulators of 45S rDNA transcription, and we found that the synergistic phenotypes shown by the double mutants suggest that RRP7 also participates in the regulation of 45S rDNA transcription.

Next steps: In addition to its role as a RBF, yeast Rrp7 is a component of the CURI complex, which coordinates transcription of genes encoding RPs with that of rDNA genes. The rDNA genes produce pre-rRNAs that are processed to render mature rRNAs. Our long-term goal is to ascertain whether plants have a complex functionally equivalent to the yeast CURI complex and whether RRP7 is one of its components.

Examination of yeast snoRNPs has identified key factors in rRNA processing. Yeast U3 snoRNA is a conserved member of the box C/D family that plays a central role in SSU processome assembly and function (Hughes and Ares, 1991; Beltrame and Tollervey, 1992, 1995). RBFs identified based on their coprecipitation with U3 snoRNA are referred to as U-three proteins (Utps; Phipps et al., 2011). Together with U3 snoRNP, one subcomplex that joins the nascent SSU processome is UtpC, including the essential Ribosomal RNA processing protein 7 (Rrp7), which is required for 18S rRNA maturation (Baudin-Baillieu et al., 1997; Krogan et al., 2004; Phipps et al., 2011), U3 snoRNA-associated protein 22 (Utp22), and the four subunits of Casein kinase 2 (CK2) (Krogan et al., 2004; Phipps et al., 2011). Yeast UtpC components also bind to the transcription factor Interact with Fork Head 1 (Ifh1) to form the CURI (CK2, Utp22, Rrp7, and Ifh1) complex, which does not belong to the SSU processome (Rudra et al., 2007).

The CURI complex is thought to play a key role in coordinating the two parallel pathways required for ribosome biogenesis in yeast: (1) the transcription of rDNA and the processing of pre-rRNAs to produce mature rRNAs, and (2) the transcription of genes encoding RPs (Rudra et al., 2007). When 35S rDNA transcription is active, most Rrp7 and Utp22 molecules are engaged in processing 35S pre-rRNAs and are not available to form CURI complexes, and this in turn allows Ifh1 to bind Repressor/activator site binding protein 1 (Rap1) and the Fork head-like 1 (Fhl1) transcription factor in the promoters of RP-encoding genes, thus activating their transcription. Conversely, when 35S rDNA transcription is less active, Ifh1 contributes to the formation of CURI complexes, it does not bind Rap1 and

Fhl1, and transcription of RP-encoding genes is not induced. Furthermore, the loss of Rrp7 function reduces 40S ribosomal subunit production and increases the expression of RP-encoding genes (Rudra et al., 2007).

ARGONAUTE1 (AGO1; Baumberger and Baulcombe, 2005) is the main *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) ribonuclease involved in posttranscriptional gene silencing pathways mediated by small RNAs, including microRNAs (miRNAs). We previously performed second-site mutagenesis of the *ago1-52* hypomorphic and viable mutant and isolated 22 extragenic suppressors. We named the corresponding genes MORPHOLOGY OF ARGONAUTE1-52 SUPPRESSED (MAS; Micol-Ponce et al., 2014). One of these genes, AT4G02720 (MAS2), encodes a perinucleolar protein that negatively regulates 45S rDNA expression (Sánchez-García et al., 2015).

In a screen based on the yeast two-hybrid (Y2H) assay, we identified 14 interactors of MAS2, including two putative RBFs, encoded by the AT2G40430 and AT5G38720 genes. AT2G40430 encodes the putative ortholog of yeast Nucleolar protein 53 (Nop53) and human (*Homo sapiens*) Glioma Tumor-Suppressor Candidate Region Gene 2 (GLTSCR2), which was named SMALL ORGAN 4 (SMO4) by Zhang et al. (2015). AT5G38720 and its plant orthologs have not been studied; it is annotated to encode a rRNA processing 7 protein at TAIR10, Araport11 and NCBI. Here, we studied the action and interactions of AT5G38720, which we have named RRP7. We show that *Arabidopsis* RRP7 is important for 18S rRNA maturation and that it is functionally related to MAS2, as well as NUCLEOLIN1 (NUC1) and HISTONE DEACETYLASE 6 (HDA6), which are epigenetic regulators of 45S rDNA transcription.

RESULTS

RRP7 Orthologs Share an RRP7-like Domain Occupying Their C-terminal Half

RRP7 is annotated at The Arabidopsis Information Resource 10 (TAIR10) and Araport11 (Cheng et al., 2017) databases as encoding a 306 amino-acid ortholog of yeast *Rrp7*. Both yeast *Rrp7* and its human *RRP7A* ortholog are essential proteins required for 18S rRNA maturation (Baudin-Baillieu et al., 1997; Krogan et al., 2004; Phipps et al., 2011; Tafforeau et al., 2013). The identities and similarities among the full-length sequences of these three proteins are low: 20.9% and 35.4% (Arabidopsis *RRP7* versus human *RRP7A*), 14.1% and 25.6% (Arabidopsis *RRP7* versus yeast *Rrp7*) and 16.4% and 32.7% (human *RRP7A* versus yeast *Rrp7*), respectively (Supplemental Figure 3).

Yeast *Rrp7* has both an N-terminal domain (NTD; amino acids 1–156), through which it dimerizes with Utp22, and a C-terminal domain (CTD; amino acids 190–297) that has RNA binding capability and is required for its association with the central domain of the 18S rRNA coding sequence of the 35S pre-rRNA. Deletion of either NTD or CTD is lethal (Lin et al., 2013). Alignment of yeast *Rrp7* with its human and Arabidopsis orthologs indicates that only the region containing the CTD is conserved to some extent (Supplemental Figure 3). According to HomoloGene (www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene), *RRP7* proteins share an RRP7-like conserved domain occupying their C-terminal half, which includes the CTD defined by Lin et al. (2013). The RRP7-like domain of Arabidopsis *RRP7* (135 aa) shares an identity and similarity of 31.6% and 52.5%, respectively, with its human ortholog (130 aa) and 23.6% and 38.9%, respectively, with that of yeast (128 aa). The amino acid sequence identity and similarity between the RRP7-like domain of human *RRP7A* and that of yeast *Rrp7* are 21.9% and 43.1%, respectively.

For multiple alignment of plant *RRP7*s, we selected one representative species from different angiosperm lineages as classified in Myburg et al. (2014). We used one gene encoding an *RRP7* factor in *Arabidopsis* (AT5G38720, this work), *Oryza sativa* (Os02g0728700), *Vitis vinifera* (VIT_14s0083g00590) and *Nicotiana sylvestris* (LOC104216441), two paralogs in *Populus trichocarpa* (POPTR_004G106900v3 and POPTR_0017s14290g) and *Phoenix dactylifera* (LOC103703294 and LOC103707756), and three in *Glycine max* (GLYMA_07G204700, GLYMA_13G171200 and GLYMA_19G087700). The rice *RRP7* ortholog is annotated as splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1, the *Nicotiana sylvestris* ortholog as DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 42 or General transcription factor IIF subunit 1, and those of *Phoenix dactylifera* as *RRP7A* (LOC103703294) and *RRP7B* (LOC103707756). In the case of multiple *RRP7* orthologs, we selected the longest isoform of the most similar protein to *Arabidopsis RRP7*, as shown by BLASTP searches, which were XP_002305975 of *Populus trichocarpa* (encoded by POPTR_004G106900v3), XP_008784326 (*RRP7A*) of *Phoenix dactylifera* (encoded by LOC103703294), and XP_003529364 (encoded by GLYMA_07G204700) of *Glycine max* (Supplemental Figure 4).

As expected, the level of conservation among plant *RRP7* orthologs was higher than that shared with *RRP7* orthologs from

other kingdoms, considering both their full-length sequences and the *RRP7*-like domain only (Supplemental Figure 4 and Supplemental Tables 1 and 2). For the full-length plant *RRP7* orthologs, the lowest identity and similarity were 29.2% and 37.6% (for *Glycine max* versus *Oryza sativa*) and the highest were 48.2% and 58.2% (for *Populus trichocarpa* versus *Vitis vinifera*), respectively. For the *RRP7*-like domains of plant *RRP7* orthologs, the lowest identity and similarity were 63.0% and 78.5% (for *Arabidopsis thaliana* versus *Populus trichocarpa*) and the highest were 81.3% and 92.5% (for *Phoenix dactylifera* versus *Vitis vinifera*), respectively.

RRP7 Plays Several Roles in Arabidopsis Development

We obtained two publicly available lines carrying T-DNA insertions disrupting AT5G38720, SAIL_628_F08 and WISCDSLOX461-464C16, which we named *rrp7-1* and *rrp7-2*, respectively (Figure 1A). Plants homozygous for these mutations were viable and indistinguishable, and they exhibited slow growth and pointed leaves (Figures 1B to 1J). This leaf phenotype is characteristic of mutations in genes encoding RPs (Van Lijsebettens et al., 1994; Horiguchi et al., 2011; Weis et al., 2015) and is similar, although a bit more severe, to the phenotype caused by null alleles of *NUCLEOLIN1* (*NUC1*). *NUC1* is a nucleolar protein involved in transcriptional regulation of 45S rDNA and 45S pre-rRNA processing (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007).

To confirm that the phenotype of *rrp7* mutants was caused by the absence of AT5G38720 activity, we constructed *RRP7_{pro}:RRP7* and *35S_{pro}:RRP7* transgenes and transferred them into *rrp7* plants, and this fully complemented the mutant phenotypes (Figures 1K to 1M). The *35S_{pro}:RRP7* and *35S_{pro}:RRP7:GFP* transgenes had no visible phenotypic effect when transferred to the wild-type Col-0 background, although both caused *RRP7* overexpression (Supplemental Figure 5).

All *rrp7-1* and *rrp7-2* plants exhibited two or three cauline leaves emerging from each axil (Figures 2B and 2C), whereas wild-type *Arabidopsis* plants produce only one per axil (Figure 2A) (Müller-Xing et al., 2015). Despite their delayed growth, the *rrp7* mutants reached a final stature similar to that of wild type (Figure 2D). Siliques of these plants contained many unfertilized ovules and only produced ~10% viable seeds compared with Col-0 siliques (Figures 2E to 2H). Flowering occurred earlier in Col-0 than in *rrp7*, which also developed an increased number of vegetative leaves before bolting (Figures 2I and 2J), suggesting that the late flowering of the mutants is not simply a consequence of slow growth.

Arabidopsis NUC1 is also referred to as *PARALLEL1* (*PARL1*) because null *parl1* mutants exhibit parallel veins in their cotyledons, vegetative leaves, sepals, and petals, a pattern never observed in wild-type plants (Petricka and Nelson, 2007). We found that *rrp7-1* cotyledons, first- and third-node leaves, and petals also exhibited aberrant venation patterns (Figure 3). The cotyledons of *rrp7-1* have two areoles (closed loops) instead of four (as in Col-0), whereas *parl1-2* cotyledons lack areoles. First- and third-node *rrp7-1* leaves, collected 21 d after stratification (DAS), exhibited a reduced number of venation branching points. The basal region of the lamina of *rrp7-1* leaves has parallel veins (Figures 3J and 3K). In Col-0, petal veins form some areoles (Figure 3D), which are absent from *rrp7-1* and *parl1-2* (Figures 3H and 3L).

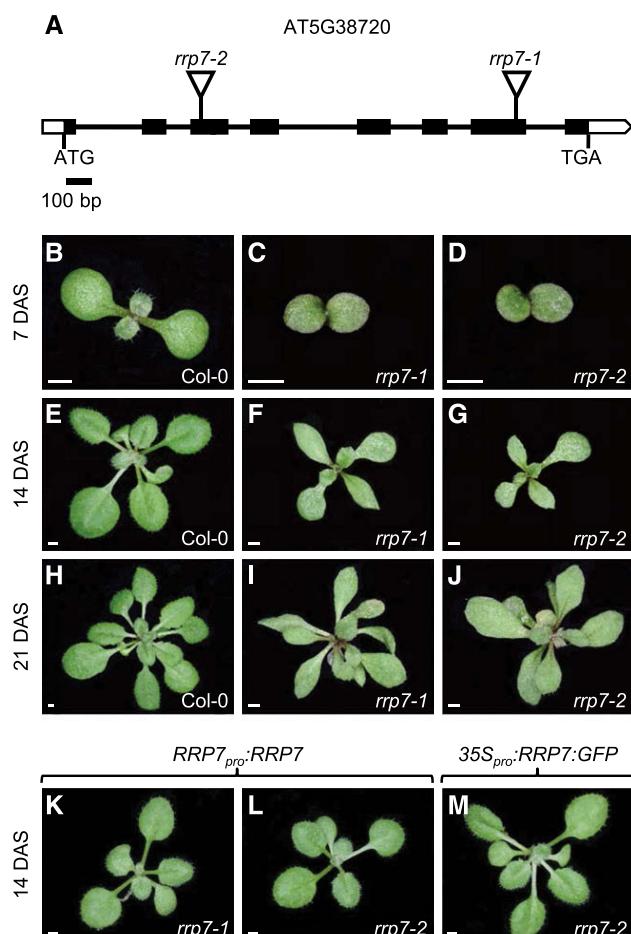


Figure 1. Structure of *RRP7* and the Molecular Nature, Rosette Phenotype, and Transgene-Mediated Complementation of its Mutant Alleles.

(A) Schematic representation of *RRP7*, including the positions and molecular nature of the *rrp7* mutations. Black boxes represent exons and open boxes represent the 5'- and 3'-UTRs. Lines between boxes represent introns, and triangles represent T-DNA insertions.

(B) to (J) Rosettes of Col-0, *rrp7-1*, and *rrp7-2* plants as indicated.

(K) to (M) Rosettes of *rrp7-1 RRP7_{pro}:RRP7* (K), *rrp7-2 RRP7_{pro}:RRP7* (L), and *rrp7-2 35S_{pro}:RRP7:GFP* (M) plants.

Photographs were taken 7 (B) to (D), 14 (E) to (G) and (K) to (M), and 21 (H) to (J) days after stratification (DAS). Scale bars: 1 mm.

Morphometric analysis of leaf venation parameters commonly used to describe vascular pattern complexity (Supplemental Table 3) confirmed that vein patterning in leaves is more defective in *rrp7-1* than in *par1-2*.

Loss of Function of *RRP7* Causes Abscisic Acid Hypersensitivity During Seedling Establishment

The role of abscisic acid (ABA) in the inhibition of seed germination under adverse conditions is well known (Lopez-Molina et al., 2001). Mutations in genes involved in several aspects of mRNA metabolism, such as pre-mRNA maturation and mRNA degradation, export, or translation cause hypersensitivity to ABA (Kuhn

et al., 2008). To determine whether *rrp7-1* plants exhibit ABA hypersensitivity, we sowed seeds of this mutant on ABA-supplemented medium. The genotypes of other seeds that we studied in this way were: *par1-2*; *smo4-3*, a null allele of the *SMO4* gene, which encodes a RBF that we found to interact with *MAS2* in Y2H assays (Sánchez-García et al., 2015); and *amiR-MAS2.1*, a transgenic line producing an artificial microRNA partially inhibiting expression of *MAS2* (Sánchez-García et al., 2015). As controls, we used *abscisic acid deficient1-104* (*aba1-104*) and *abscisic acid insensitive4-2* (*abi4-2*) seeds, which are hypersensitive and insensitive to ABA, respectively (Quesada et al., 2000).

As expected, the germination rates of these seeds did not differ—all seeds germinated like their respective wild types (data not shown). However, the seedling establishment rates clearly differed among lines (Figure 4). Whereas almost all Col-0 seedlings exhibited expanded cotyledons on 0.5 μ M ABA, only 3.4 \pm 3.9% of *rrp7-1* seedlings did so, and no expanded cotyledons were detected at higher ABA concentrations. The values for *par1-2* were 45.8 \pm 7.7% at 0.5 μ M, 14.8 \pm 4.2% at 1.5 μ M (50.4 \pm 4.7% of Col-0), and 0.2 \pm 0.7% at 3 μ M ABA (10.4 \pm 2.4% of Col-0). The *amiR-MAS2.1* plants were more sensitive to ABA than Col-0 at all concentrations tested, but to a lesser extent than *par1-2* and *rrp7-1*. No significant differences were detected between *smo4-3* and Col-0.

RRP7 Expression Is Widespread, and Its Promoter Shares Regulatory Elements with *SMO4* and *MAS2*

According to the eFP Browser and the TraVA databases (see Methods), *RRP7* is expressed in all organs and at all developmental stages, with maximum expression at the beginning of seed germination. We constructed a transgene that had the *GUS* reporter gene driven by the *RRP7* promoter (*RRP7_{pro}:GUS*). We detected GUS staining in all tissues of *RRP7_{pro}:GUS* plants, whose flowers and siliques showed no GUS activity (Supplemental Figure 6), perhaps because the GUS assay is much less sensitive than microarray and RNA-seq analyses. Another possibility is that the 1,026-bp genomic region upstream of the translation start codon of *RRP7* does not contain all of regulatory elements. It has been shown that the majority of the regulatory elements (86%) in *Arabidopsis* are located proximal to the transcription start site (TSS; +1 bp position), from -1,000 bp to +200 bp (Yu et al., 2016).

We also analyzed the *RRP7*, *SMO4* and *MAS2* promoters using the PLACE and Athena databases (see “Methods” and Supplemental Figure 7). We found a TELOBOXATEEF1AA1 motif (AAACCCTAA) at the -20 to -12 bp position in the *RRP7* promoter, and two identical GCCCATTA motifs in the *SMO4* promoter at -52 to -44 and -82 to -74 bp from its TSS. These motifs correspond to the UP1ATMSD (GGCCCAWW, where W is A or T) element, which also appears twice in the *MAS2* promoter, once (GGCCAATA) at -65 to -57 and once (inverted) at -82 to -77 bp (TATTGGGCC). Enrichment of the UP1ATMSD motif has been found in the promoters of genes upregulated after main stem decapitation in *Arabidopsis* (Tatematsu et al., 2005). The TELOBOXATEEF1AA1 is a longer version of the UP2ATMSD (AAACCCTA) and Telo-box (Short interstitial telomere) motifs (AAACCCWA; where W is A or T). The latter sequence is identical to the repeat units of plant telomeres and has been preferentially found in 5' flanking regions of *Arabidopsis* and rice genes

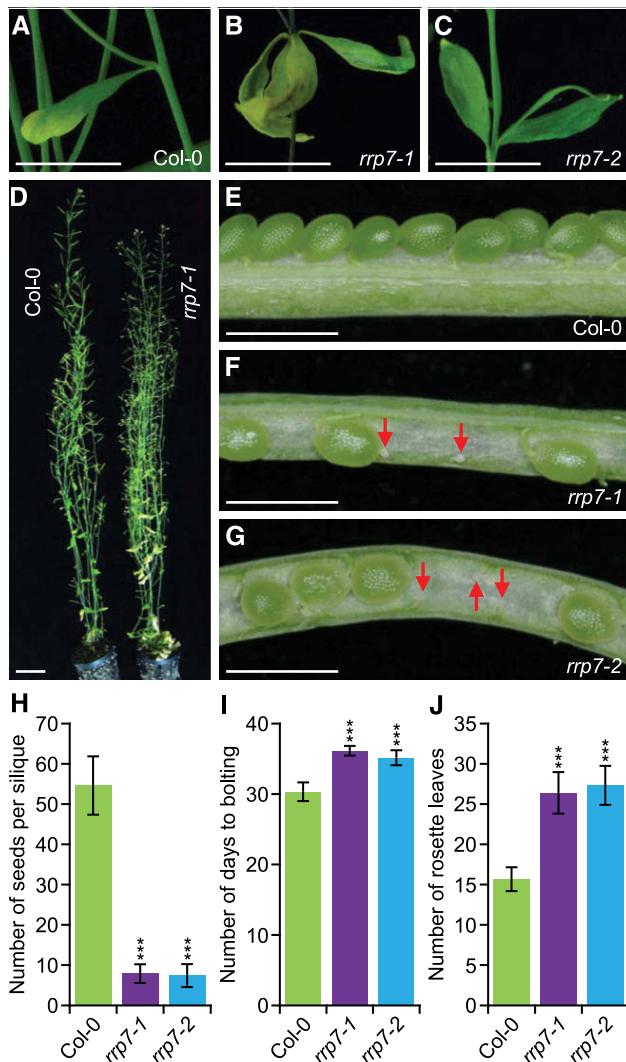


Figure 2. Pleiotropic Morphological Phenotype of *rrp7* Plants.

(A) to (C) Presence of a single cauline leaf in the axils of Col-0 stems (A), and three cauline leaves in the axils of *rrp7* mutant stems (B) and (C). (D) Adult Col-0 and *rrp7-1* plants. (E) to (G) Dissected siliques from Col-0 (E), *rrp7-1* (F), and *rrp7-2* (G) plants. Red arrows indicate unfertilized ovules. (H) Fertility of *rrp7* plants, expressed as the number of seeds per silique. Seeds from ten siliques collected from five plants per genotype were counted. (I) Flowering time (number of days from stratification to bolting) in the *rrp7* mutants. (J) Number of rosette leaves that developed before bolting in *rrp7* plants. The assays shown in (I) and (J) were performed with at least 30 plants of each genotype. Photographs were taken at 60 DAS (A) to (G). Error bars in (H) to (J) indicate standard deviations. Asterisks indicate values significantly different from the corresponding wild type in a Student's *t* test (***p* < 0.001). Scale bars = 1 cm (A) to (C); 3 cm (D); and 1 mm (E) to (G).

encoding components of the ribosome biogenesis machinery, including RPs, snoRNAs, and RBFs (Tremousaygue et al., 1999; Gaspin et al., 2010). The UP1ATMSD and UP2ATMSD motifs are enriched among genes encoding RPs (Ma et al., 2012). These results reinforce the hypothesis of a functional relationship among *RRP7*, *SMO4*, and *MAS2* and their activity in ribosome biogenesis.

RRP7 Is Mainly a Nucleolar Protein

To visualize the subcellular localization of RRP7, we generated translational fusions of *RRP7* and the gene encoding the green fluorescent protein (GFP), under the control of the *RRP7* endogenous promoter (*RRP7_{pro}*:*RRP7*:GFP) or the 35S promoter (35S_{pro}:*RRP7*:GFP). The *RRP7*:GFP fusions were functional, as shown by full complementation of the mutant phenotype of *rrp7* plants (Figure 1M). To visualize GFP fluorescence, we used roots of Col-0 plants stained with Hoechst 33,342. This dye binds strongly to double-stranded DNA and counterstains the nucleus, but not the nucleolus, which contains mainly RNA. As expected, identical GFP-fluorescence signals were detected in the nucleolus using both the *RRP7_{pro}*:*RRP7*:GFP (Figure 5A to 5C) and 35S_{pro}:*RRP7*:GFP transgenes. The GFP signal was broader than the nucleolus and slightly overlapped with the DAPI-stained region.

To determine whether RRP7 is exclusively nucleolar, we performed a fluorescent immunoassay using an antibody against fibrillarin, a conserved nucleolar methyltransferase that directs 2'-O-ribose methylation of pre-rRNAs, a commonly used nucleolar marker. RRP7 and fibrillarin partially colocalized, because the GFP signal occupied a larger portion of the nucleolus than fibrillarin. In addition, a small portion of the GFP signal clearly colocalized with DAPI around the nucleolus (Figures 5D to 5I).

18S rRNA Maturation Is Impaired in the *rrp7* Mutants

In yeast, *rrp7* null mutations cause lethality, and *rrp7* conditional alleles reduce production of the mature 18S rRNA and 40S ribosomal subunits. In these mutants, depletion of 18S rRNA appears to be mainly due to the inhibition of cleavage at the A₂ site in 32S pre-rRNA, which leads to a loss of 27SA₂ and 20S pre-rRNAs (Supplemental Figure 1) (Baudin-Baillieu et al., 1997). In addition, yeast Rrp7 coimmunoprecipitates with 90S pre-ribosomes containing 35S or 23S pre-rRNAs (Lin et al., 2013).

To determine whether RRP7 plays a role in Arabidopsis 45S pre-rRNA processing, we performed gel blot analyses of RNA extracted from *rrp7* plants, using the S7 and S9 probes (Lange et al., 2011), which bind the ITS1 and ITS2 regions of 45S pre-rRNA processing intermediates, respectively (Figure 6A and Supplemental Figure 2). Using the S9 probe, we found that the *rrp7-1* and *rrp7-2* mutants overaccumulated the 35S(P), 33S(P') and/or 32S pre-rRNAs, and had much higher levels of 27SA₂, 27SA₃, and/or 27SB pre-rRNAs than did wild-type plants or the complemented *rrp7-1 RRP7_{pro}*:*RRP7* plants (Figures 1K and 6B). Hybridization with the S7 probe indicated that the accumulated early precursor was 35S(P). In addition, we found a strong accumulation of P-A₃ pre-rRNA—an intermediate of the ITS1-first pathway for 18S rRNA maturation—in *rrp7-1* and *rrp7-2* but not in Col-0 or *rrp7-1 RRP7_{pro}*:*RRP7* plants (Figure 6C and Supplemental Figure 2).

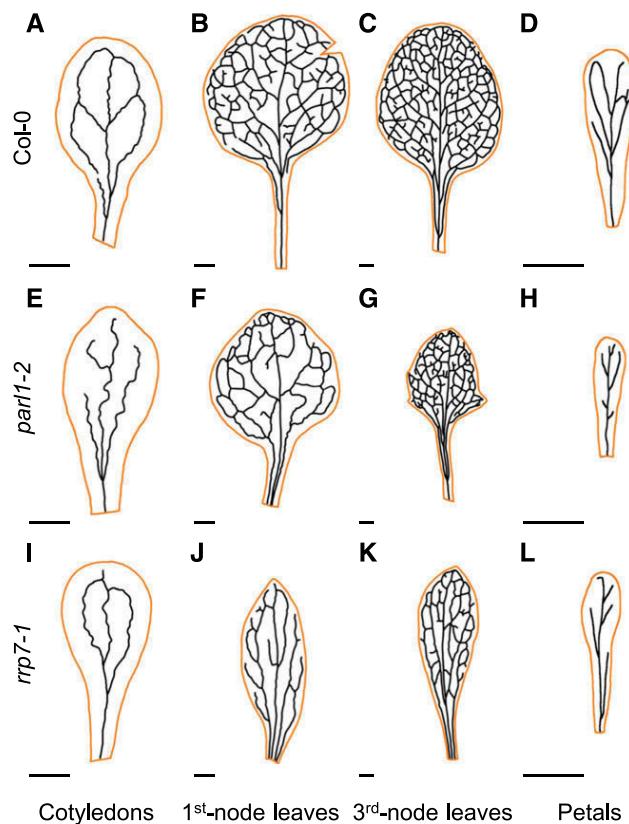


Figure 3. Aberrant Venation Patterns in *par1-2* and *rrp7-1* Cotyledons, Vegetative Leaves, and Petals.

(A) to (L) Diagrams were drawn from micrographs taken from cotyledons (A), (E) and (I), first-node leaves (B), (F) and (J), third-node leaves (C), (G) and (K), and petals (D), (H) and (L). Cotyledons and leaves were collected at 21 DAS and petals were collected at 63 DAS from Col-0 (A) to (D), *par1-2* (E) to (H), and *rrp7-1* (I) to (L) plants. Cotyledon, leaf and petal margins are shown in orange. Scale bars = 1 mm.

An additional RNA gel blot analysis was performed using the p42-p43 probe, which hybridizes to the A₂-A₃ segment of ITS1 and allows detection of 27SA₂ and 27SA₃, but not 27SB pre-rRNAs (Hang et al., 2014). We did not detect any 27SA pre-rRNA species with the p42-p43 probe (Supplemental Figure 8); this observation suggests that the 27SB pre-rRNA is the major contributor to the overaccumulation of 27S pre-rRNAs visualized by the S9 probe in *rrp7* mutants (Figures 6A and 6B). These results suggest that RRP7 participates in the P' site cleavage at the 5'-ETS-first pathway, in the P₁ cleavages at the ITS1-first pathway, and in the C₂ cleavage, after the convergence of both pathways.

We performed several circular RT-PCR amplifications to unequivocally identify the products overaccumulated in *rrp7* plants, discriminating among 35S(P), 33S(P'), and 32S pre-rRNAs; among 27SA₂, 27SA₃, and 27SB pre-rRNAs; and among P-A₃ and the other 18S rRNA precursors. We circularized total RNA, and the circular molecules obtained were reverse transcribed with primers hybridizing into the mature 18S or 25S rRNA sequences (Supplemental Table 4). The cDNAs obtained from circular

molecules containing the 18S and 25S rRNA sequences were PCR amplified with different primer sets (Supplemental Table 4).

The r1+r2 primer pair should allow the amplification of 35S(P), 33S(P'), and 32S pre-rRNAs (Figure 6A). We found reduced 32S and increased 35S(P) pre-rRNA levels in *rrp7* plants, compared with Col-0 and *rrp7-1 RRP7_{pro}:RRP7* plants (Figure 6D). This result confirms that the band observed by RNA gel blotting using the S7 and S9 probes (Figure 6B and 6C) corresponds to the 35S(P) intermediate. The r3+r2 vs. r4+r2 primer pairs allowed us to discriminate among the 27SA₂, 27SA₃ (only with r4+r2), and 27SB pre-rRNAs (Figure 6A). With the r3+r2 primer pair, we found much less 27SA₂ pre-rRNA in *rrp7* mutants than in Col-0 or *rrp7-1 RRP7_{pro}:RRP7*. On the other hand, the r4+r2 primer pair also revealed increased amounts of the 27SB intermediate in *rrp7* plants (Figure 6D). We could not amplify the 27SA₃ intermediate, probably because it is rapidly processed to 27SB. These results show that RRP7 participates in the earlier steps of 45S pre-rRNA processing, in which cleavage at the P', P₁ and P₂ sites of 5'-EST occurs (Supplemental Figure 2).

To confirm the nature of the product that we found to be overaccumulated by RNA gel blots using the S7 probe (Figures 6A and 6C), we amplified the cDNA obtained from reverse transcription of circularized RNAs containing the 18S rRNA sequence using the r5+r6 primer pair. These primers should amplify the P-A₃, P'-A₃, and 18S-A₃ pre-rRNAs, which are intermediates of the ITS1-first pathway of 18S rRNA maturation (Figure 6A and Supplemental Figure 2). We concluded that the overaccumulated intermediate detected by the S7 probe is the P-A₃ pre-rRNA (Figure 6D), supporting the requirement of RRP7 for cleavage at the P₁ site in the ITS1-first pathway (Supplemental Figure 2). We also found reduced the 18S-A₃ pre-rRNA in the *rrp7* mutants. These results also confirm that RRP7 participates in the P₂ cleavage at the ITS1-first pathway.

The patterns of accumulation of intermediate species of the rRNA biogenesis pathway found in *rrp7* plants were opposite to those found in Arabidopsis *prmt3* plants, which carry a mutant allele of the Arabidopsis *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 3 (PRMT3)* gene. Loss of PRMT3 function causes over-accumulation of the 18S-A₃ and 27SB intermediates, suggesting that PRMT3 promotes the major (ITS1-first) pathway and inhibits the minor (5'-EST-first) pathway for 45S pre-rRNA processing (Supplemental Figure 2; Hang et al., 2014).

In *rrp7* Mutants, the 25S/18S Ratio Is Increased and 18S rRNA Species Accumulate in the Nucleolus

We examined the rRNA profiles of the *rrp7* mutants using an Agilent 2100 Bioanalyzer, as previously used in a functional analysis of putative RBFs in human HeLa cells (Tafforeau et al., 2013). The 25S/18S mature rRNA ratios were 1.97 ± 0.06 in the *rrp7* mutants and 1.33 ± 0.15 in the wild type (Supplemental Figure 9). Taken together, these results indicate that RRP7 is required for the synthesis and/or stabilization of mature 18S rRNA species. In addition, the rRNA ratios in *rrp7* are reminiscent of the reduced 18S rRNA levels observed in yeast *rrp7* conditional mutants by Baudin-Baillieu et al. (1997).

Because the above results suggest that 45S pre-rRNA processing is defective in the *rrp7* mutants, we performed RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH), using probes that detect

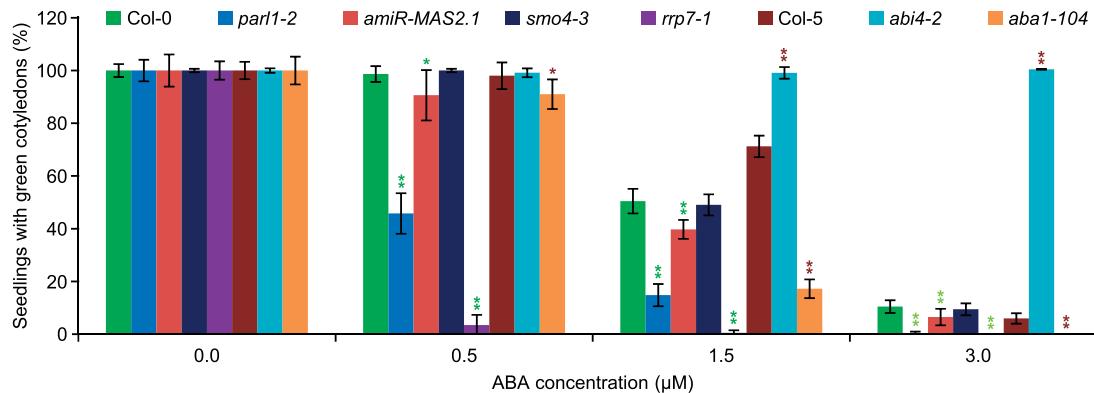


Figure 4. Effect of Exogenous ABA on *rrp7-1*, *smo4-3*, *par1-2*, and *amiR-MAS2.1* Plants.

Percentage of seedlings grown in medium supplemented with different concentrations of ABA that displayed green, fully expanded cotyledons when scored at 10 DAS. The *abi4-2* and *aba1-104* mutants were used as controls. The experiment was repeated three times, each with 156 seeds of each genotype, sown onto three different plates. Error bars indicate sd. Asterisks indicate values significantly different from the corresponding wild type in a Student's *t* test (* $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$). The genetic background of *abi4-2* and *aba1-104* is Col-5, and that of all other mutants is Col-0.

the mature 25S, 18S, or 5.8S rRNAs, as well as their respective precursors. No alteration in the subnuclear localization of 5.8S rRNA was detected (Figures 7E to 7G, 7L to 7N), but nucleolar hypertrophy and accumulation of one or more molecules containing the 18S rRNA sequence, probably the P-A₃ precursor, were observed in the *rrp7-1* mutant (Figures 7B and 7I). In addition, we observed a strong 25S rRNA signal within *rrp7* nucleoli, which seems similar in intensity to that within the wild-type nucleoli, but with a larger area, due to nucleolar hypertrophy (Figures 7C to 7D, 7J to 7K).

To quantify the size of the nucleolus, we stained cells with DAPI and acridine orange, which emits green or red fluorescence depending on whether it is bound to DNA or RNA, respectively. The ratio of the size of the nucleolus to the size of the whole cell was significantly higher ($n = 200$, $p < 0.001$) in *rrp7-1* plants (0.28 ± 0.07 ; Figures 7R to 7T) than in Col-0 (0.21 ± 0.06 ; Figures 7O to 7Q). These results confirm that 18S rRNA maturation is impaired in *rrp7-1* plants and suggest that accumulation of 18S rRNA precursors, in particular the P-A₃ pre-rRNA, contributes to nucleolar hypertrophy, as has been proposed for other *Arabidopsis* mutants defective in rRNA maturation (Lahmy et al., 2004; Abbas et al., 2010; Chen et al., 2016). We cannot exclude, however, that the other alterations of 45S pre-rRNA processing shown by *rrp7* mutants contribute to nucleolar hypertrophy. In addition, it is likely that assembly and export of the pre-40S particles containing the precursors of the ITS1-first pathway are impaired in the *rrp7* mutants.

Expression of the 45S rDNA Variants Is Altered in *rrp7* and *smo4* Mutants

Four different variants (VARs) exist among the hundreds of copies of the 45S rDNA gene in *Arabidopsis*. These VARs differ in their 3'-ETS sequences and their temporal and spatial expression patterns, as observed in wild-type accessions (Figure 8A and 8B; Pontvianne et al., 2010). The number of genomic copies of each variant does not appear to be related to its expression levels. Indeed, VAR1 is the most abundant 45S rDNA variant in Col-0, but

it is only expressed during seed germination, and this accession contains few copies of VAR2, but they are highly expressed. The temporal expression pattern of VAR1 is modified by mutant alleles of NUC1 (Pontvianne et al., 2010).

The similar phenotypes of *par1-2* and *rrp7* mutants prompted us to analyze the abundance of each VAR and its expression level in the *smo4-3* and *rrp7-1* mutants. Using the p3+p4 primer pair (Figure 8A and Supplemental Table 4), we amplified by PCR the 45S rDNA 3'-ETS and measured its corresponding transcript levels by RT-PCR (Pontvianne et al., 2010) using RNA extracted from plants collected 14 DAS. There was no significant difference in the genomic content of each VAR among the mutants and wild type (Figure 8D and 8E). We did not detect VAR1 expression in Col-0, and VAR2 was much more highly expressed than VAR3 and VAR4, which were expressed at similar levels (Figure 8C; Pontvianne et al., 2010). However, heterochronic expression of VAR1 was detected in *smo4-3* and *rrp7-1*, and increased expression of VAR2 and VAR3 was detected in *smo4-3* at the same ratio as that of Col-0. VAR3 expression levels were higher in *rrp7-1* than in Col-0. These results suggest that as already known for NUC1, SMO4 and RRP7 also participate in the regulation of 45S rDNA expression and are required for the negative regulation of VAR1. Changes in the relative abundance of 45S rRNA variants are usually interpreted as changes in their transcription (Kojima et al., 2007; Pontvianne et al., 2010; Durut et al., 2014). Our results, however, could also indicate differential turnover of the variants.

RRP7 Interacts Synergistically with MAS2, NUC1, and HDA6

Double mutant analysis is a classical genetic approach to the understanding of functional relationships between genes (Pérez-Pérez et al., 2009). To genetically confirm the physical interaction of RRP7 with MAS2 that we detected in our previous Y2H-based screen (Sánchez-García et al., 2015), we obtained double mutant combinations of *rrp7-1* with *mas2-1*, a viable *MAS2* allele that is a dominant informational suppressor of *ago1*-

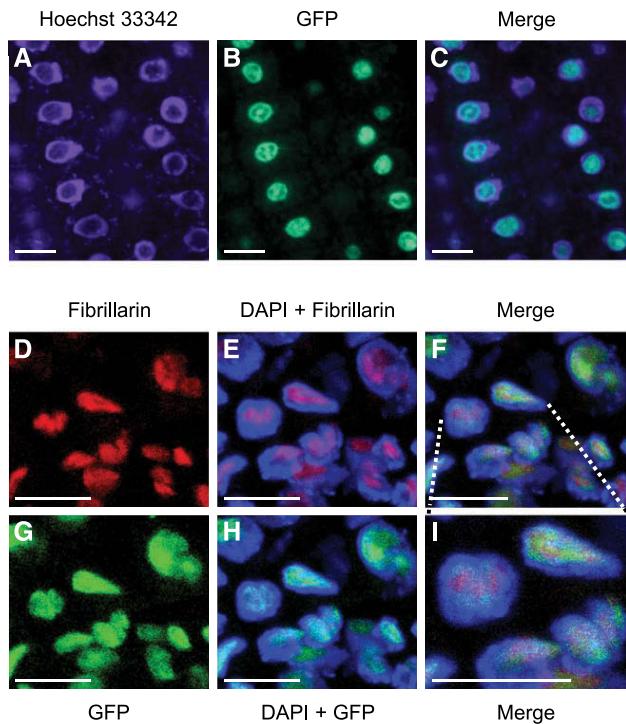


Figure 5. Subcellular Localization of RRP7.

(A) to (C) Confocal laser-scanning micrographs of roots from plants homozygous for the *RRP7_{pro}:RRP7:GFP* transgene. Fluorescence signals correspond to Hoechst 33342 (A), GFP (B), and the merged image (C). (D) to (I) Immunolocalization of fibrillarin in plants homozygous for the *RRP7_{pro}:RRP7:GFP* transgene. Fluorescence signals show: fibrillarin detection in red (D) and (E); DAPI staining in blue (E) and (H); GFP fluorescence in green (G) and (H); and the corresponding merged images (F) and (I). Scale bars = 10 μ m.

52 and lacks phenotypic effects per se in a wild-type genetic background (Sánchez-García et al., 2015). The *rrp7-1 mas2-1* double mutant displayed a synergistic phenotype, with very much dwarfed rosettes and narrow, pointed cotyledons and leaves (Figure 9A and 9F, and Supplemental Figure 10). Despite their strong morphological aberrations, *rrp7-1 mas2-1* double mutant plants completed their life cycles and produced some seeds.

The physical interaction of SMO4 and RRP7 with MAS2 in Y2H assays (Sánchez-García et al., 2015), the regulatory elements shared by their promoters, and the synergistic phenotypes of the *rrp7-1 mas2-1* plants prompted us to obtain the *rrp7-1 smo4-3* double mutant, which was morphologically indistinguishable from the *rrp7-1* single mutant (Figure 9B, 9G and Supplemental Figure 10).

The abovementioned temporal expression pattern of *VAR1* is also modified by mutant alleles of *NUC2* (Pontvianne et al., 2007), a partially redundant paralog of *NUC1*, and the *HISTONE DEACETYLASE6* (*HDA6*; Aufsatz et al., 2002); *NUC1*, *NUC2* and *HDA6* are epigenetic regulators of 45S rDNA transcription (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2010; Layat et al., 2012; Durut et al., 2014). To determine whether any of these genes interacts with *RRP7*, we obtained double mutant

combinations of *rrp7-1* with *parl1-2*, *nuc2-2*, or *hda6-7*. The *rrp7-1 parl1-2* plants exhibited very short roots and small rosettes with narrow leaves that accumulated anthocyanins (Figure 9C, 9H and Supplemental Figure 10). Rosettes of *rrp7-1 nuc2-2* plants were morphologically similar to those of *rrp7-1* but larger with pale leaves (Figure 9D, 9I and Supplemental Figure 10). Although *hda6-7* plants were barely distinguishable from wild type (Figure 9E and Supplemental Figure 10), *rrp7-1 hda6-7* plants displayed the most extreme phenotype among the double mutants obtained, with very much dwarfed rosettes (Figure 9J and Supplemental Figure 10). Unexpectedly, flowering was earlier in *rrp7-1 hda6-7* than in the *rrp7-1* or *hda6-7* single mutants, both of which are late-flowering. Only some plants produced some seeds, most of which (83.33%; $n = 20$) failed to germinate. These synergistic phenotypes reveal a functional relationship of *RRP7* with *NUC1* and *HDA6*.

DISCUSSION

In Silico Analyses Support the Evolutionary Conservation of RRP7 as an RBF

Essential cellular functions, such as the translation of mRNA into protein, are evolutionarily conserved. The 80S ribosome is the molecular machine that performs protein synthesis in the cytoplasm in Eukarya; its mature structure is very similar in all organisms studied, although its biogenesis in fungi, plants, and metazoans exhibits both evolutionary conservation and diversification (Tafforeau et al., 2013; Woolford and Baserga, 2013).

A number of RBFs have been extensively studied in yeast and some have also been studied in human and/or mouse cells; comparative analyses have provided examples of both conservation and divergence. However, only a few RBFs have been experimentally studied in plants (Weis et al., 2015). For example, both yeast Rrp7 and human RRP7A share an NTD and a CTD, but only the CTD is conserved (to some extent) in *Arabidopsis* RRP7. These findings suggest that the ability of Rrp7 to bind pre-rRNAs within preribosomal particles is conserved in *Arabidopsis* RRP7 and human RRP7A, but dimerization with an Utp22 ortholog is conserved only in RRP7A. Indeed, mammalian Utp22 orthologs exist (Utama et al., 2002), including mouse nucleolar RNA-associated protein (Nrap) and human nucleolar protein 6 (NOL6), whose interaction with RRP7A was demonstrated by affinity-purification mass spectrometry. However, a role for NTD in such dimerization is yet to be demonstrated (Hutlin et al., 2015).

According to HomoloGene, AT1G63810 encodes the *Arabidopsis* ortholog of Utp22. This gene has not been studied and is annotated as encoding a nucleolar protein in Araport11 and as Nrap-like in the ARAMEMNON database (Schwacke et al., 2003). The protein shares 31.3% identity with yeast Utp22 and 33.8% with NOL6 and Nrap. As *Arabidopsis* RRP7 lacks an NTD, it likely does not interact with the AT1G63810 gene product, unless they dimerize in a way substantially different from that of RRP7A with NOL6 (and Rrp7 with Utp22). Both, RRP7 and Utp22 have recently been found in the *Arabidopsis* nucleolar proteome (Montacié et al., 2017).

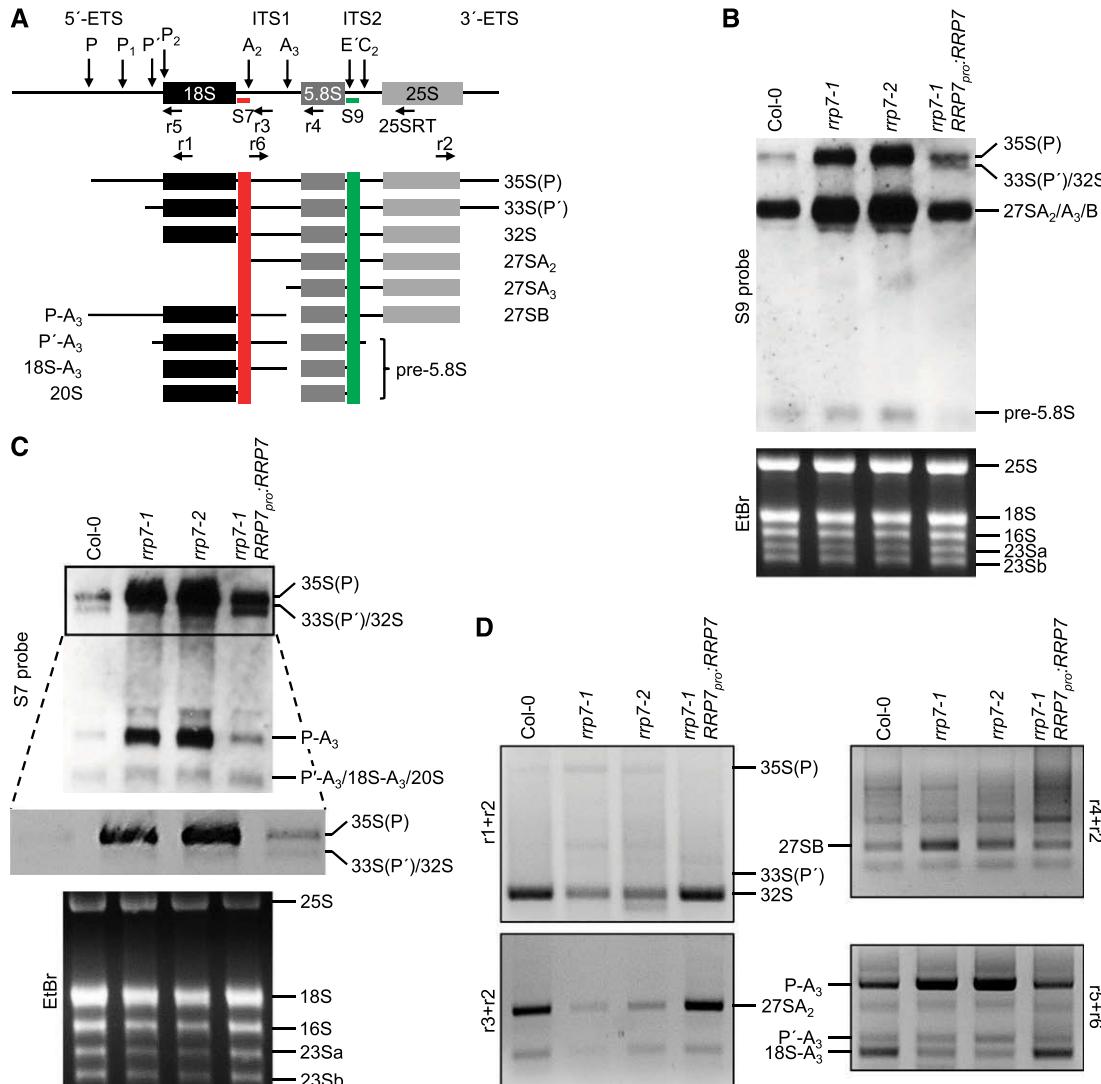


Figure 6. Early Steps in 45S pre-rRNA Processing and 18S rRNA Maturation in the *rrp7* Mutants.

(A) Diagram illustrating the pre-rRNAs that can be detected in an RNA gel blot using the S7 and S9 probes. Modified from Hang et al. (2014). 5'-ETS and 3'-ETS, external transcribed spacers. ITS1 and ITS2, internal transcribed spacers. Red and green vertical stripes mark the regions of the pre-rRNAs to which the S7 and S9 probes hybridize, respectively.

(B) and (C) RNA gel blots. Total RNA was separated in formaldehyde-agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized with the S9 (B) and S7 (C) probes. RNA was extracted from Col-0, *rpp7-1*, *rpp7-2*, and *rpp7-1 RRP7_{pro}:RRP7* plants. EtBr: photographs of ethidium bromide-stained gels taken before blotting as loading controls. The 16S, 23Sa and 23Sb bands correspond to chloroplast rRNAs. A magnified view of the selected region is shown in (C), corresponding with a very short exposure time, which allows distinction between the 35S(P), and 33(P')/32S pre-rRNAs.

(D) Ethidium bromide-stained agarose gels (negative images) visualizing circular RT-PCR products. RNA was circularized and reverse transcribed using the 25SRT primer, and the cDNA obtained was PCR amplified with the r1+r2, r3+r2 and r4+r2 primer pairs. The cDNA PCR amplified with the r5+r6 primer pair was obtained from RNA circularized and reverse transcribed using the r1 primer.

We identified the RRP7 and SMO4 RBFs in a Y2H-based screen for interactors of MAS2, the Arabidopsis ortholog of human NKAP (Sánchez-García et al., 2015). MAS2, SMO4, and RRP7 appear to be expressed in all tissues and developmental stages, particularly in actively dividing cells (Sánchez-García et al., 2015; Zhang et al., 2015; this work). Cis regulatory elements usually map within the -1,000 to +200 bp (including introns) regions of Arabidopsis gene

promoters relative to the TSS, with a peak at -50 bp (Yu et al., 2016). Indeed, we identified known regulatory elements within the -85 to -1 bp upstream regions of the MAS2, SMO4, and RRP7 promoters. These elements are shared by many genes related to the translational machinery, providing additional support for the assignment of MAS2, SMO4, and RRP7 to the functional class of proteins related to the translational apparatus.

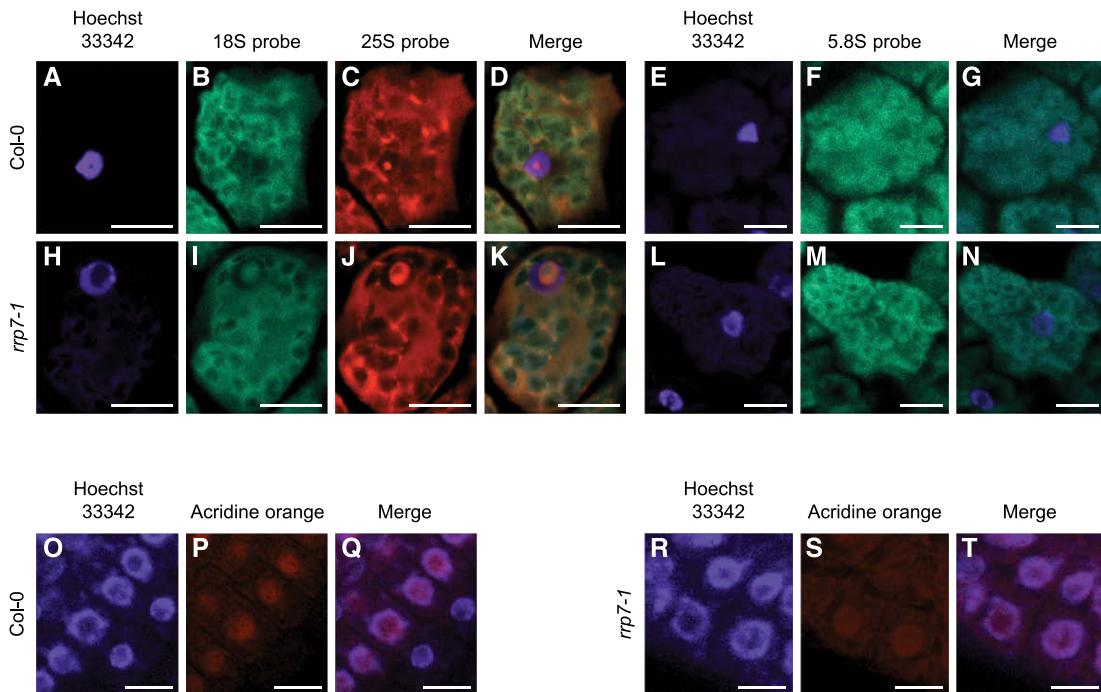


Figure 7. Subcellular Localization of 25S, 18S, and 5.8S rRNA Species in *rrp7-1* Plants.

(A) to (T) Fluorescence signals correspond to Hoechst 33342 (A), (H), (O) and (R), an 18S probe (B) and (I), a 25S probe (C) and (J), a 5.8S probe (F) and (M), acridine orange (P) and (S), and their corresponding merged images (D), (K), (G), (N), (Q) and (T). Scale bars = 10 μ m.

Loss of *RRP7* Function Causes Pleiotropic Developmental Effects, but Not Lethality

Most yeast, human, and Arabidopsis genes encoding RBFs are single-copy genes. Their null alleles, however, are lethal in yeast and human or mouse cells, but not in Arabidopsis, and this is the case for *RRP7* (this work). A plausible explanation for the viability and relatively mild phenotypes of the *rrp7* mutants is that yeast either does not use alternative pre-rRNA processing pathways or uses these pathways to a lesser extent than does Arabidopsis. In another example, the Arabidopsis *mtr4* null alleles are viable and have mild phenotypes, whereas their mammalian and yeast equivalents are lethal. Accumulation of pre-rRNAs would occur as a consequence of *rrp7* or *mtr4* mutations, but the levels of mature rRNAs would be sufficient for viability owing to the alternative pre-rRNA processing pathway(s).

Some other Arabidopsis genes encoding RBFs mentioned in this work (*NUC1* and *XRN2*) have a redundant paralog, which explains their mild mutant phenotypes. The severe phenotypes of the *nuc1 nuc2* and *xrn2 xrn3* double mutants confirm this explanation (Zakrzewska-Placzek et al., 2010; Durut et al., 2014). By contrast, null alleles of the genes encoding other Arabidopsis RBFs, such as orthologs of yeast *Rrp5*, Periodic tryptophan protein 2 (Pwp2), Nin one binding protein 1 (Nob1; Supplemental Figure 1), Essential nuclear protein 1 (Enp1), and Nucleolar complex protein 4 (Noc4) cause lethality in Arabidopsis, as do null alleles of their orthologs in yeast (Missbach et al., 2013).

Although *RRP7* is not essential, it appears to play important roles in physiology and development as shown by the pleiotropic

phenotype of the *rrp7* mutants, which exhibit a pointed-leaf phenotype and defective leaf-vein patterning (two well-known traits of ribosomal mutants; Van Lijsebettens et al., 1994; Petricka and Nelson, 2007; Horiguchi et al., 2011; Weis et al., 2015), delayed growth, altered phyllotaxy, late flowering, partial infertility, and hypersensitivity to exogenous ABA at the seedling establishment stage. A deficiency in mature ribosome levels might explain these phenotypes, although it is not clear why a general reduction in mRNA translation causes specific defects in processes as diverse and specific as phyllotaxy regulation, flowering time control, embryogenesis, lateral organ venation patterning (or provascular cell differentiation), and ABA perception.

The absence of *RRP7* or *NUC1* or the depletion of *MAS2* (but not the absence of *SMO4*) caused ABA hypersensitivity at the seedling establishment stage. The strongest effect was observed in *rrp7* plants and the weakest was observed in *amiR-MAS2.1* plants. These results suggest that *RRP7*, *NUC1*, and *MAS2* contribute (to different extents) to the negative regulation of ABA responses. RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 (RACK1) and eIF6 are also required for normal ribosome production and negatively regulate ABA responses in Arabidopsis; *rack1* mutants are hypersensitive to ABA (Guo and Chen, 2008; Guo et al., 2009). In addition to its known role as a seed germination inhibitor under adverse conditions, ABA appears to play a role in the regulation of ribosome biogenesis. During germination, chromatin is decondensed at nucleolar organizer regions, histone acetylation at the 45S rDNA promoters increases, and transcription of these genes is induced, but the opposite process occurs in plants grown in the

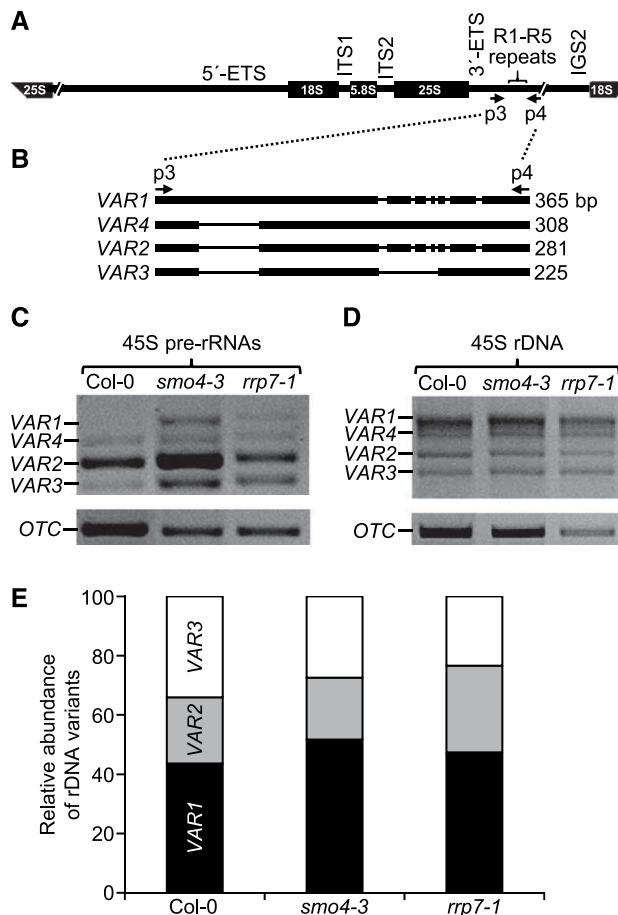


Figure 8. 45S rDNA VAR Expression in *smo4-3* and *rrp7-1*.

(A) and (B) Schematic representation of the 45S pre-rRNA (A) and its 3'-ETS polymorphic region (B). 5'-ETS and 3'-ETS, external transcribed spacers. ITS1 and ITS2, internal transcribed spacers. The p3 and p4 primers were used for PCR amplifications (Supplemental Table 4).

(C) to (E) PCR analysis of the relative abundance of 45S rDNA variants (VAR1-VAR4) in reverse-transcribed RNA (C), and genomic DNA (D) and (E), from Col-0, *smo4-3*, and *rrp7-1* plants as indicated. Relative amounts of each 45S rDNA variant (E) were determined using the Agilent DNA 1000 kit on an Agilent 2100 Bioanalyzer. VAR4 was not detected. The *ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE* (OTC) housekeeping gene (Quesada et al., 1999) was used as an internal control in (C).

presence of ABA (Zhang et al., 2012). ABA also induces the expression of DEAD-BOX ATP-DEPENDENT RNA HELICASE 57 (*RH57*), whose product is involved in 45S pre-rRNA processing; the *rh57-1* null mutant is hypersensitive to ABA (Hsu et al., 2014). In addition, Arabidopsis NUC1 is likely a substrate of SUCROSE NONFERMENTING 1 (SNF1)-RELATED PROTEIN KINASE 2 (*SNRK2*) in response to ABA (Umezawa et al., 2013; Wang et al., 2013). The auxin gene expression1-5 (*axe1-5*) allele of the *HDA6* gene also causes hypersensitivity to ABA (Chen et al., 2010). Notably, we found a synergistic phenotype in the *rrp7-1 hda6-7* double mutant, indicating a genetic interaction between *RRP7* and *HDA6*.

RRP7 Is a Mainly Nucleolar Protein that Is Required for 18S rRNA Maturation

An analysis of the nuclear proteome of *Arabidopsis* identified 1602 proteins in the nucleolar fraction and 2544 in the nuclear fraction, 1429 of which overlapped; RRP7 was detected in both fractions (Palm et al., 2016). Consistent with these findings, we found that RRP7 mainly localized to the nucleolus but also was found at its periphery, which might correspond to the perinucleolar compartment in human cells. This dynamic structure is enriched in RNA binding proteins, including RNA polymerase III, nucleolin, and factors involved in the regulation of alternative splicing (Pollock and Huang, 2010). The only overlapping subnuclear localization of the RRP7 and MAS2 interacting proteins is the periphery of the nucleolus, which could indicate a role for RRP7 in splicing, as already proposed for MAS2 (Sánchez-García et al., 2015).

The information about RRP7 factors is very scarce, with most information coming from *Saccharomyces cerevisiae* Rrp7. The function of yeast Rrp7 has been deduced based on the effects of its deletion, conditional depletion, and site-directed mutagenesis on growth and molecular phenotypes, including the accumulation of pre-rRNAs in *rrp7* mutants (Lin et al., 2013). The yeast Rrp7 protein is part of the SSU processome, which synthesizes the 18S rRNA via cotranscriptional cleavage at the A₀, A₁, and A₂ sites of the 35S pre-rRNA, generating 27SA₂ and 20S pre-rRNAs (Supplemental Figure 1). By contrast, the 23S pre-rRNA, which includes most of the 5'-ETS, results from endonucleolytic cleavage at the A₃ site of the 35S pre-rRNA prior to cleavage at the A₀, A₁, and A₂ sites via an alternative pathway (Supplemental Figure 1; Granneman and Baserga, 2004; Chaker-Margot et al., 2017). Both the 23S and 21S pre-rRNAs accumulate in yeast *rrp7* conditional mutants (Baudin-Baillieu et al., 1997). The 21S pre-rRNA results from cleavage at the A₁ site (corresponding to the *Arabidopsis* P₂ site; Supplemental Figures 1 and 2) of 22S pre-rRNA, which in turn is produced by cleavage of 23S pre-rRNA at A₀ site (which could be equivalent to the *Arabidopsis* P' site; Supplemental Figures 1 and 2). Accumulation of the 23S and 21S pre-rRNAs reveals that cleavage of A₀ and A₁ is delayed in *rrp7* mutants. Therefore, Rrp7 is required primarily for cleavage at A₂ site (A₂ in *Arabidopsis*), but also to a lesser extent at A₁ (P₂) and A₀ (P') sites.

We demonstrated that *Arabidopsis* RRP7 is involved in 18S rRNA maturation, as is yeast Rrp7. In the *Arabidopsis* *rrp7* mutants studied here, some 18S rRNA precursors overaccumulate, whereas others are depleted, compared with wild type. Overaccumulation or depletion of a pre-rRNA indicates that it is the substrate or the product, respectively, of a partially or completely blocked processing step that requires RRP7. We found increased levels of 35S(P) and reduced amounts of the 32S and 27SA₂ pre-rRNAs, but the 27SA₃ and P-A₃ pre-rRNAs were not depleted. These observations clearly indicate that RRP7 is required for P' site cleavage at the 5'-ETS-first pathway, but not for A₃ site cleavage at the ITS1-first pathway. The participation of RRP7 in the cleavage of the P' site of 35S(P) pre-rRNA suggests the possibility of a similar role at the P' site of P₁-A₃ pre-rRNA. The levels of the substrate (P₁-A₃) and product (P'-A₃) of this step of the ITS1-first pathway, however, were indistinguishable from those of the wild type (Supplemental Figure 2 and Figure 10).

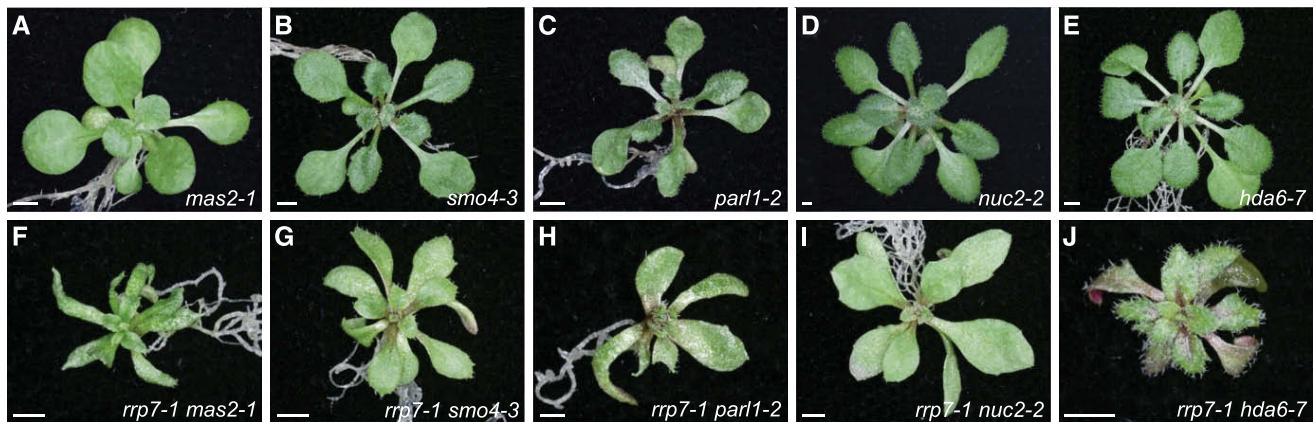


Figure 9. Genetic Interactions of *rrp7-1* with *mas2-1*, *smo4-3*, *parl1-2*, *nuc2-2*, and *hda6-7*.

(A) to (J) Phenotypes of rosettes of single (A) to (E) and double (F) to (J) mutants. Images show rosettes of *mas2-1* (A), *smo4-3* (B), *parl1-2* (C), *nuc2-2* (D), and *hda6-7* (E) plants (top row) along with *rrp7-1 mas2-1* (F), *rrp7-1 smo4-3* (G), *rrp7-1 parl1-2* (H), *rrp7-1 nuc2-2* (I), and *rrp7-1 hda6-7* (J) plants (bottom row). Photographs were taken at 21 DAS. Scale bars = 1 mm.

Depletion of 32S and 27SA₂ pre-rRNAs could be a consequence of defective cleavage at the P' site of the 35S(P) precursor; nevertheless, it may also be caused by altered cleavage at the P₂ site of 33S(P') pre-rRNA. The latter hypothesis is supported by the reduction of the 18S-A₃ pre-rRNA, which is likely to be due to defective cleavage at the P₂ site of P'-A₃ pre-rRNA. However, no increase in P'-A₃ pre-rRNA was observed. We also detected substantial accumulation of the P-A₃ intermediate, indicating defective P₁ site cleavage at the ITS1-first pathway. Furthermore, overaccumulation of 27SB pre-rRNAs also suggests the participation of RRP7 in the cleavage at the C₂ site, which would involve RRP7 not only in 18S rRNA maturation but also in the maturation of the 25S and 5.8S rRNAs (Supplemental Figure 2 and Figure 10). However, alteration in the mature 25S and 5.8S rRNA levels is not supported by the increased 25S/18S rRNA ratio that we have found (Supplemental Figure 9). An alternative explanation to the implication of RRP7 in C₂ site cleavage is that the primary effect of its depletion is to impair 18S rRNA production in the *rrp7* mutants. Thus, the increased 27SB pre-rRNA level would be an indirect effect of RRP7 depletion.

Compared with yeast *Rrp7*, less is known about mammalian *Rrp7a*, a single-copy gene that has also been named *Gastric cancer antigen Zg14*, since it was identified in a search for human immunogenic proteins for gastric cancer (Liné et al., 2002). *Rrp7a* was annotated in large-scale cDNA sequencing projects (Kawai et al., 2001; Okazaki et al., 2002). According to HomoloGene, the human RRP7A protein shares 83.9% identity and 91.8% similarity with its mouse *Rrp7a* ortholog. Mouse *Rrp7a* is expressed in preimplantation embryos and is required for the morula-to-blastocyst transition, as shown by the lethality caused by its knockdown by microinjection of double-stranded RNA in zygotes (Maserati et al., 2014). Surprisingly, *Rrp7a* is found throughout the cytoplasm but not in the nucleus of eight-cell blastomeres, prompting the authors to suggest that this protein is a structural component of the ribosome. More recently, however, human RRP7A has been identified as a member of the nucleolar proteome of HeLa cells, and its depletion by small interfering RNAs caused

a reduction in the levels of 21S and 18S-E pre-rRNAs, both of which are precursors of the 18S rRNA (Tafforeau et al., 2013).

Our results indicate high functional conservation between yeast and Arabidopsis RRP7 proteins because in both cases their loss cause overaccumulation of 18S rRNA precursors of the ITS1-first pathway. However, due to the differences of this pathway in yeast and Arabidopsis, it is not easy to identify the equivalent cleavage sites. Arabidopsis RRP7 seems to participate mainly in the cleavage of the P' and P₁ sites, both of which could correspond to A₀ in yeast. However, yeast *Rrp7* and Arabidopsis RRP7 also could be functionally divergent in their functions. Yeast *Rrp7* is specifically involved in 18S rRNA maturation and has not been found to participate in 5.8S or 25S rRNA maturation, but Arabidopsis RRP7 may participate in their maturation. The inability of Arabidopsis *rrp7* mutants to use both pathways to produce mature 18S rRNA would reduce the concentration of the 18S rRNA and consequently, the number of 40S pre-ribosomal particles able to assemble into mature 80S ribosomes. In this model, *rrp7* cells would have an excess of 60S subunits compared with 40S subunits, and this would explain their increased 25S/18S rRNA ratio, which in turn leads to a deficiency in mature ribosomes, thereby causing delayed growth (Supplemental Figure 9 and Figure 1B to 1G).

In addition, the nucleolus is enlarged in *rrp7* cells, likely due to the accumulation of 18S rRNA species, particularly the P-A₃ intermediate, which we detected by RNA-FISH. Enlarged nucleoli have been observed in other mutants affected in genes encoding RBFs, such as *arabidopsis pumilio23-1* (*pum23-1*) and *RNA helicase10* (*rh10-1*; Matsumura et al., 2016). In *pum23-1* plants, 18S and 5.8S rRNA precursors accumulate, but their mature rRNAs do not, indicating that, like RRP7, APUM23 is involved in 35S pre-rRNA processing and/or the degradation of pre-rRNA processing byproducts (Abbasi et al., 2010).

As mentioned in the Introduction, the loss of function of yeast *Rrp7* reduces 18S rRNA production, which in turn induces the expression of RP-encoding genes and causes a deficiency in the formation of 40S ribosomal subunits and leads to subsequent lethality (Rudra et al., 2007). Our in silico analysis revealed putative

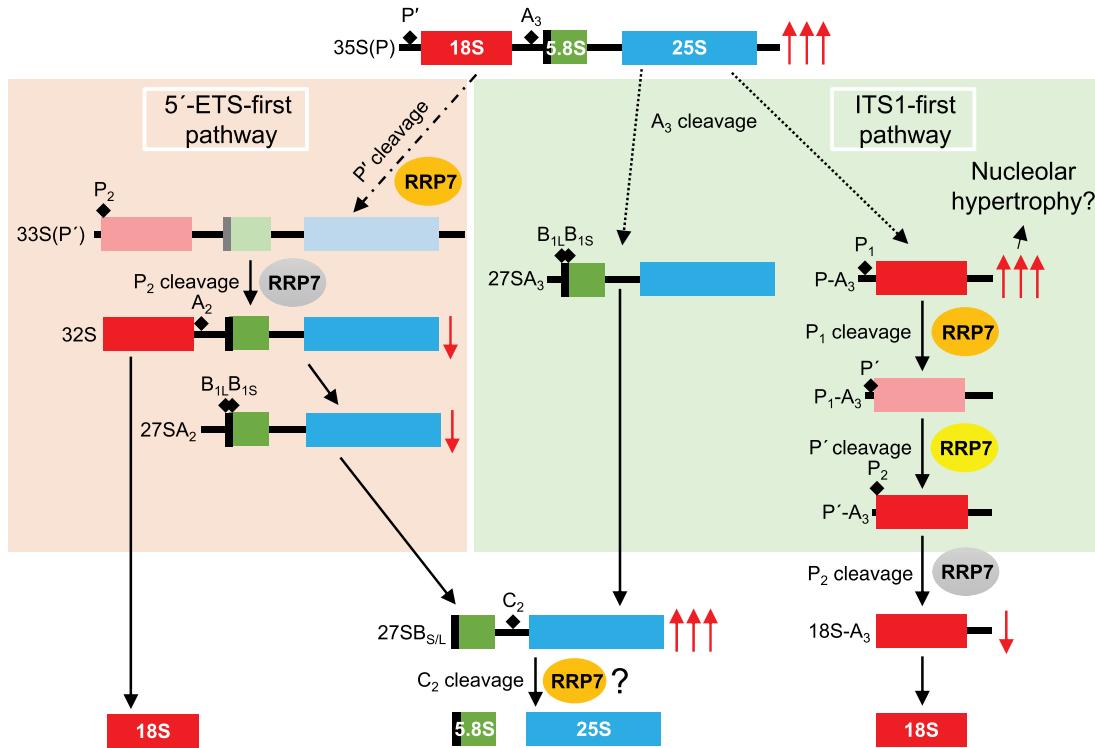


Figure 10. Proposed Roles for RRP7 in 45S pre-rRNA Processing Based on the Molecular Phenotype of the *rrp7* Mutants.

Red arrows indicate over-accumulated ($\uparrow\uparrow\uparrow$) or depleted (\downarrow) pre-rRNAs, as detected by RNA gel blots and circular RT-PCR assays using the *rrp7* mutants. In our model, Arabidopsis RRP7 is assumed to participate in the steps of 45S pre-rRNA processing in which the substrate is overaccumulated in the *rrp7* mutants (P' , P_1 , and C_2 cleavages; orange ovals). The question mark in C_2 cleavage (bottom middle) indicates that overaccumulation of 27SB pre-rRNA can alternatively be explained as an indirect effect of impaired 18S rRNA production. RRP7 might also participate in the steps in which the product is depleted in the *rrp7* mutants (P_2 cleavages; gray ovals). Because RRP7 participates in the P' cleavage at the 5'-ETS-first pathway, it might also cleave the same site at the ITS1-first pathway (yellow oval). Short-lived pre-rRNAs are shown in faint colors. Other details are as shown in Supplemental Figure 2.

Arabidopsis orthologs of the Utp22 and CK2 members of the CURI complex, but not of Ifh1, suggesting that Arabidopsis lacks a CURI complex. However, we cannot exclude the possibility that RRP7 forms part of another complex that coordinates the pathways for the biogenesis of rRNA and RP ribosome components.

Null mutations of yeast *Rrp7* are lethal. By contrast, the lack of function of Arabidopsis *RRP7* and human *RRP7A* impairs 18S rRNA biogenesis but the mutants are viable. This observation cannot be explained by functional redundancy because both are single-copy genes. More studies will be required to understand this difference and the absence of anomalies in ribosome biogenesis in Arabidopsis *rrp7* mutants. Our results might shed light on the activity of the mammalian orthologs of Arabidopsis RRP7, given the scarcity of information available.

RRP7 Is Functionally Related to MAS2, HDA6, and NUC1

Several of our in silico and experimental results suggest that *RRP7* and *MAS2* are functionally related. In addition, the synergistic phenotypes of *rrp7-1 parl1-2* and *rrp7-1 mas2-1* are very similar, indicating that *RRP7* genetically interacts with *NUC1* and *MAS2*. The merely additive phenotype of *rrp7-1 nuc2-2* plants was expected, given that *NUC2* expression is almost

undetectable in wild-type plants and that this gene is thought to play a marginal role in ribosome biogenesis compared with *NUC1* (Durut et al., 2014). The extremely severe phenotype of *rrp7-1 hda6-7* suggests a relationship of *RRP7* with *HDA6* closer than with *NUC1* or *MAS2*.

MAS2 participates in the control of 45S rDNA expression, as well as splicing (Sánchez-García et al., 2015). *NUC1* is involved in the regulation of 45S rDNA expression and 45S pre-rRNA processing (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007). *HDA6* participates in several epigenetic processes, including 45S rDNA, transgene, and transposon silencing (Aufsatz et al., 2002; Probst et al., 2004; Earley et al., 2010), but it has not been associated with 45S pre-rRNA processing. The link between *MAS2*, *NUC1*, and *HDA6* is their participation in the regulation of 45S rDNA transcription, a process that might involve *RRP7*. This genetic evidence reinforces the notion that *RRP7* is involved in 45S rDNA transcriptional regulation. Indeed, we detected heterochronic activation of the *VAR1* 45S rDNA variant in the *rrp7* mutants. We cannot rule out the possibility that this is an indirect effect caused by impaired 45S pre-rRNA processing if 45S rDNA transcription is subjected to negative feedback self-regulation. On the other hand, deregulation of 45S rDNA transcription does not appear to contribute to the phenotype of *rrp7*, because in *hda6* and

smo4 plants, *VAR1* is also heterochronically misexpressed and their developmental phenotypes are very mild (Pontvianne et al., 2010; this work). In conclusion, our findings demonstrate that *RRP7* acts as a plant RBF, functionally related to *MAS2*, *NUC1* and *HDA6*, and they increase our understanding of the conservation and diversification of *RRP7* function among eukaryotes.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

The *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Columbia-0 (Col-0) wild-type accession was initially obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; Nottingham, UK) and propagated at our laboratory for further analysis. Seeds of the *rrp7-1* (SAIL_628_F08), *rrp7-2* (WISCD-SLOX461-464C16), *parl1-2* (SALK_002764; Petricka and Nelson, 2007), *mtr4-2* (GK_048G02; Lange et al., 2011), *hda6-7* (also named *rts1-1*; Aufsatz et al., 2002) and *nuc2-2* (GABI_178D01; Durut et al., 2014) mutants were also provided by NASC. The *mas2-1* allele was isolated in our laboratory (Sánchez-García et al., 2015). All T-DNA insertional mutants were in the Col-0 background. Plant culture, seed sterilization, and sowing were performed as previously described (Ponce et al., 1998; Berná et al., 1999).

Culture medium was supplemented, when required, with hygromycin ($15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). ABA sensitivity assays were conducted with three plates per genotype, each sown with 52 mutant and 52 wild-type seeds, and the assays were repeated three times. For these ABA assays, the medium was supplemented with 0, 0.5, 1.5, and $3 \mu\text{M}$ ABA, and non-germinated seeds, seeds exhibiting aborted germination, and seedlings with expanded, green cotyledons were scored 10 DAS. The scores of each line were obtained after calculating the percentages of germinated seedlings on supplemented medium versus the same line on non-supplemented medium.

Gene Nomenclature and Genotyping

RRP7 can be found under accession number AT5G38720 at TAIR (<http://arabidopsis.org>) and Araport (<http://araport.org>). *NUC1* and *NUC2* have been also termed *PARL1* and *PARALLEL1-LIKE 1* (*PARLL1*), respectively (Petricka and Nelson, 2007). *HDA6* is also annotated as *AXE1* (*AUXIN GENE EXPRESSION 1*; Murfett et al., 2001), *RNA-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL SILENCING 1* (*RTS1*; Aufsatz et al., 2002), and *RPD3-LIKE HISTONE DEACETYLASE 3B* (*RPD3B*).

The presence of T-DNA insertions in the genes under study was verified by PCR using the primers shown in Supplemental Table 4. Discrimination between the wild-type *MAS2* and mutant *mas2-1* alleles was performed as described in Sánchez-García et al. (2015).

RNA Isolation, RT-PCR, RNA Gel Blot, and Circular RT-PCR Assay

Each biological replicate of RNA was isolated with TRI RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich). RNA samples were either treated twice with DNase using 2 U of TURBO DNase (TURBO DNA-free Kit, Thermo Fisher Scientific) per microgram of RNA or not treated, depending of their use for RT-PCR or RNA gel blots, respectively.

RT-PCR experiments were performed using three biological replicates, each replicate consisting in a pool of three plants. Each plant of a pool was selected from a different plate. PCR amplifications of 45S rDNA or RNA variants for the determination of its relative abundance in genome and expression were performed with the p3+p4 primer pair (Supplemental Table 4) using genomic DNA or cDNA as templates, respectively, from plants collected 15 DAS. Genomic DNA was isolated using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), and RNA and cDNA were prepared as previously described. RT-PCR products were visualized by electrophoresis in an

agarose gel, whereas PCR products from genomic DNA were purified with the Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter), processed in a 2100 Bioanalyzer using the Agilent DNA 1000 kit and PCR products, and the relative abundance of each variant was determined with the 2100 Expert Software (Agilent Technologies).

RNA gel blot analyses were performed with digoxigenin (DIG)-labeled probes: the S7 and S9 probes are 5'-DIG labeled oligonucleotides (Eurofins Genomics), and the p42-p43 probe was obtained by PCR using 11-DIG-dUTP (Roche) and the p42+p43 primer pair. Primers for the synthesis of both probes (Supplemental Table 4) were described in Lange et al. (2011). RNA gel blot analysis of $3 \mu\text{g}$ of total RNA samples was performed in 1.2% (w/v) agarose/formaldehyde or 6% polyacrylamide/8 M urea gels. The RNA was visualized and transferred via cross-linking to an Amersham Hybond N+ nylon membrane (Thermo Fisher Scientific). Electrophoresis, hybridization, and detection were performed as previously described (Jover-Gil et al., 2014). In brief, the membrane was prehybridized for 2 h at 65°C and hybridized overnight at 65°C with $149 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of probe. No blocking agent was added to the hybridization solution, as recommended by the manufacturer. The membrane was incubated with $0.05 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ of Fab fragments from an anti-digoxin antibody from sheep, conjugated with alkaline phosphatase (α -DIG-AP, Fab fragments; Roche), washed twice, equilibrated in detection buffer, and incubated with 25 mM CDP-Star (Roche) diluted 1:200 in detection buffer for 5 min in the dark. Visualization of RNA bands was performed by developing Lumi-film chemiluminescent films (Roche) that were exposed to the membrane for 20 min or overnight.

Circular RT-PCR was performed as described in Hang et al. (2014), using $5 \mu\text{g}$ of total RNA. The 25SRT and r1 primers (Supplemental Table 4) were used for reverse transcription of circularized 25S and 18S rRNA precursors, respectively, using Maxima reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed with the r1+r2, r3+r2, r4+r2, and r5+r6 primer pairs (Supplemental Table 4).

Construction of Transgenic Lines

Transgenic plants were obtained as described in Sánchez-García et al. (2015). The transgenes were obtained using the pGEM-T Easy221 entry vector and the pMDC32, pMD164, pMDC83, and pMDC107 destination vectors (Curtis and Grossniklaus, 2003). To construct the $35S_{pro}\text{-}RRP7$ and $35S_{pro}\text{-}RRP7\text{:GFP}$ overexpression transgenes, the full-length coding sequence (with stop codons removed to obtain the GFP translational fusions) of *RRP7* was PCR amplified from Col-0. The 1,026-bp genomic region upstream of the translation start codon of *RRP7* was PCR amplified and used as the promoter to drive the *RRP7 pro*:*GUS*, and *RRP7 pro*:*RRP7:GFP* constructs. All constructs were verified by sequencing before being transferred into plants. Primers used to obtain these constructs and for Sanger sequencing are described in Supplemental Table 4. Sanger sequencing was performed with ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kits on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems [now Thermo Fisher Scientific], Waltham, MA, USA).

Morphometry, Histology, Histochemical Assays, and RNA-FISH

A Nikon D-Eclipse C1 confocal microscope was used for microscopy. Micrographs were digitally processed using EZ-C1 operation software (Nikon). For venation pattern morphometry, the phenoVein software (<http://www.plant-image-analysis.org/>) was used with samples of cotyledons, leaves, and petals, which were collected, cleared, and mounted on slides, and the corresponding micrographs taken and converted into diagrams as previously described (Candela et al., 1999; Robles et al., 2010; Jover-Gil et al., 2012).

GUS assays were performed as described by Robles et al. (2010): GUS activity was analyzed in plants homozygous for the *GUS* transgene, and

photographs were taken from three plants from each of three independent lines per genotype.

Visualization of RRP7 subcellular localization was performed in roots from *RRP7_{pro}:RRP7:GFP* or *35S_{pro}:RRP7:GFP* transgenic plants collected at 10 DAS. For immunolocalization with fibrillarin, *RRP7_{pro}:RRP7:GFP* seedlings were collected at 10 DAS and squashed on slides in a mix of 1x PBS and 4% paraformaldehyde. Immunodetection of fibrillarin was performed using a 1:250 dilution of the mouse monoclonal anti-fibrillarin antibody [38F3] (Abcam), followed by detection with a 1:1,000 dilution of TRITC (tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate)-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Sigma-Aldrich). Nuclei were stained as previously described (Diaz-Tielas et al., 2012) with Hoechst 33342 and the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

RNA-FISH was performed as described in Parry et al. (2006), with some modifications. Approximately 100 cells from first- and second-node leaves from 10 plants collected at 12 DAS per genotype were analyzed. The leaves were fixed in glass vials at 600 mbar for 25 min. Probes were obtained using the labeled oligonucleotides shown in Supplemental Table 4 and were used in a 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hybridization solution. Samples were mounted on slides with a drop of Vectashield antifade mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) containing 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Hoechst 33,342.

Acridine orange staining was performed as described by Hirano et al. (2011). Nucleoli outlines were drawn on a Wacom DTF-720 Pen Display with the Adobe Photoshop CS3 software, and outline areas were measured using the NIS Elements AR 3.1 image analysis package. The ratio between the nucleolus and whole cell areas was obtained from \sim 200 cells from 10 plants per genotype.

Bioinformatic and Statistical Analyses

BLASTP searches were performed against the sequences for all organisms at the National Center for Biotechnology Information BLASTP server (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul et al., 1997) using the NCBI non-redundant database with default settings. Alignments were obtained with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Larkin et al., 2007) and shaded with BOXSHADE3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Pair-wise identity and similarity percentages were calculated from the alignments using the Ident and Sim feature of the Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html; Stothard, 2000).

For promoter analysis, the Scan tool of the PLACE (Plant *cis*-acting regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>; Higo et al., 1998, 1999) and Athena (<http://bioinformatics1.smb.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>; O'Connor et al., 2005) databases were used. The original PLACE website is no longer available, but its data set of regulatory motifs can be accessed at http://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#en.

Spatiotemporal gene expression patterns were obtained from the TraVA (Transcriptome Variation Analysis) database (<http://travadb.org/>; Klepikova et al., 2016), which is based on RNA-seq data. For TraVA output visualization, the Raw Norm option was chosen for read counts number type, and default values were chosen for all other options. To compare the mutant, transgenic, and wild-type lines, the Mann-Whitney *U*-test ($n \leq 10$) or Student's *t* test ($n > 10$) was used.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative database under the following accession numbers: *ABA1* (AT5G67030), *ABI4* (AT2G40220), *HDA6* (AT5G63110), *NUC1* (AT1G48920), *NUC2* (AT3G18610), *MAS2* (AT4G02720), *OTC* (AT1G75330), *RRP7* (AT5G38720), *SMO4* (AT2G40430). Germplasm

included seeds of *rrp7-1* (SAIL_628_F08), *rrp7-2* (WISCDSLOX461-464C16), *parl1-2* (SALK_002764; Petricka and Nelson, 2007), *mtr4-2* (GK_048G02; Lange et al., 2011), *hda6-7* (also named *rts1-1*; Aufsat et al., 2002) and *nuc2-2* (GABI_178D01; Durut et al., 2014) that were provided by NASC.

Supplemental Data

Supplemental Figure 1. Overview of 35S pre-rRNA Processing in Yeast.

Supplemental Figure 2. Overview of 45S pre-rRNA Processing in Arabidopsis.

Supplemental Figure 3. Sequence Conservation among Human, Yeast, and Arabidopsis RRP7 Putative Orthologs.

Supplemental Figure 4. Sequence Conservation among Plant RRP7 Putative Orthologs.

Supplemental Figure 5. Morphological Phenotype and *RRP7* mRNA Levels of *35S_{pro}:RRP7:GFP* and *35S_{pro}:RRP7* Plants.

Supplemental Figure 6. Spatial Expression Pattern of *RRP7*.

Supplemental Figure 7. Motifs Related to the Translational Apparatus Found in the Promoters of *MAS2*, *SMO4*, and *RRP7*.

Supplemental Figure 8. Gel Blot Analysis of RNA Isolated from the *rrp7* Mutants Using the p42-p43 Probe.

Supplemental Figure 9. Agilent 2100 Bioanalyzer Electropherogram Profiles of Total RNA Samples Extracted from Col-0, *rrp7-1*, and *rrp7-1 RRP7_{pro}:RRP7* Plants.

Supplemental Figure 10. Genetic Interactions of *rrp7-1* with *mas2-1*, *smo4-3*, *parl1-2*, *nuc2-2*, and *hda6-7*.

Supplemental Table 1. Identity and Similarity Among Full-Length Representative Plant RRP7 Putative Orthologs.

Supplemental Table 2. Identity and Similarity among the RRP7-like Domains of Representative Plant RRP7 Putative Orthologs.

Supplemental Table 3. Morphometry of Leaf Venation in the *rrp7-1* and *parl1-2* Mutants.

Supplemental Table 4. Oligonucleotides Used in this Work.

Supplemental References.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.M. Serrano-García, J. Castelló-Bañuls, M.J. Níñez-Gómez and S.B. Ingham for their excellent technical assistance, and F.J. Medina for his help and advice with fibrillarin immunolocalization. We also thank B. Scheres for the pGEM-T Easy221 vector and J.L. Micó for useful discussions, comments on the manuscript, and the use of his facilities. This research was supported by grants from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad of Spain (BIO2014-56889-R and BIO2017-83629-R) and the Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/006) to M.R.P., by a UPVd fellowship to C.M. and an ANR-17-CE12-0026-01 grant to J.S.V.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.R.P. conceived and supervised the study, obtained funding and provided resources. M.R.P., R.M.-P., and R.S.-M. designed the methodology. All authors performed the research. M.R.P. and R.M.-P. wrote the original draft. All authors reviewed and edited the manuscript.

Received March 26, 2018; revised September 4, 2018; accepted October 24, 2018; published October 25, 2018.

REFERENCES

- Abbasi, N., Kim, H.B., Park, N.I., Kim, H.S., Kim, Y.K., Park, Y.I., and Choi, S.B.** (2010). APUM23, a nucleolar Puf domain protein, is involved in pre-ribosomal RNA processing and normal growth patterning in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**: 960–976.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M., and Matzke, A.J.** (2002). HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J.* **21**: 6832–6841.
- Baudin-Baillieu, A., Tollervey, D., Cullin, C., and Lacroute, F.** (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5023–5032.
- Baumberger, N., and Baulcombe, D.C.** (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 11928–11933.
- Beltrame, M., and Tollervey, D.** (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* **11**: 1531–1542.
- Beltrame, M., and Tollervey, D.** (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J.* **14**: 4350–4356.
- Berná, G., Robles, P., and Micol, J.L.** (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**: 729–742.
- Candela, H., Martínez-Laborda, A., and Micol, J.L.** (1999). Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Dev. Biol.* **205**: 205–216.
- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S.** (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science* **355**: aal1880.
- Chen, L.T., Luo, M., Wang, Y.Y., and Wu, K.** (2010). Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *J. Exp. Bot.* **61**: 3345–3353.
- Chen, Y.C., Wang, H.J., and Jauh, G.Y.** (2016). Dual Role of a SAS10/C1D Family Protein in Ribosomal RNA Gene Expression and Processing Is Essential for Reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **12**: e1006408.
- Cheng, C.Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., and Town, C.D.** (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* **89**: 789–804.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**: 462–469.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Sotelo, T., Reigosa, M.J., and Sánchez-Moreiras, A.M.** (2012). The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell Environ.* **35**: 1500–1517.
- Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., de Bures, A., Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., Merret, R., and Echeverria, M., et al.** (2014). A duplicated *NUCLEOLIN* gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1330–1344.
- Earley, K., Pontvianne, F., Wierzbicki, A., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.** (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* **24**: 1119–1132.
- Gaspin, C., Rami, J.F., and Lescure, B.** (2010). Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biol.* **10**: 283.
- Granneman, S., and Baserga, S.J.** (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp. Cell Res.* **296**: 43–50.
- Guo, J., and Chen, J.G.** (2008). RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **8**: 108.
- Guo, J., Wang, J., Xi, L., Huang, W.D., Liang, J., and Chen, J.G.** (2009). RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **60**: 3819–3833.
- Hang, R., Liu, C., Ahmad, A., Zhang, Y., Lu, F., and Cao, X.** (2014). *Arabidopsis* protein arginine methyltransferase 3 is required for ribosome biogenesis by affecting precursor ribosomal RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 16190–16195.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.E.** (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**: 225–242.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Higo, H.** (1998). PLACE: a database of plant cis-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Res.* **26**: 358–359.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**: 297–300.
- Hirano, T., Matsuzawa, T., Takegawa, K., and Sato, M.H.** (2011). Loss-of-function and gain-of-function mutations in FAB1A/B impair endomembrane homeostasis, conferring pleiotropic developmental abnormalities in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**: 797–807.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Tsukaya, H.** (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* **65**: 724–736.
- Hsu, Y.F., Chen, Y.C., Hsiao, Y.C., Wang, B.J., Lin, S.Y., Cheng, W.H., Jauh, G.Y., Harada, J.J., and Wang, C.S.** (2014). AtRH57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of glucose-mediated abscisic acid accumulation during seedling development and additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose. *Plant J.* **77**: 119–135.
- Hughes, J.M., and Ares, M., Jr.** (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J.* **10**: 4231–4239.
- Hutlin, E.L., Ting, L., Bruckner, R.J., Gebreab, F., Gygi, M.P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., Dong, R., and Guarani, V., et al.** (2015). The BioPlex Network: A systematic exploration of the human interactome. *Cell* **162**: 425–440.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R.** (2012). The microRNA pathway genes AGO1, HEN1 and HYL1 participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1322–1333.
- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., and Ponce, M.R.** (2014). Multi-gene silencing in *Arabidopsis*: a collection of artificial microRNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. *Plant J.* **80**: 149–160.
- Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., Adachi, J.,**

- and Fukuda, S., et al.; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium (2001). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* **409**: 685–690.
- Kiss, A.M., Jády, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E., and Kiss, T. (2002). A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res.* **30**: 4643–4649.
- Klepikova, A.V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D., and Penin, A.A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* **88**: 1058–1070.
- Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Sáez-Vásquez, J., Echeverría, M., Nakagawa, T., Ishiguro, S., and Nakamura, K. (2007). Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J.* **49**: 1053–1063.
- Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., and Lalev, A., et al. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell* **13**: 225–239.
- Kuhn, J.M., Hugouvieux, V., and Schroeder, J.I. (2008). mRNA cap binding proteins: effects on abscisic acid signal transduction, mRNA processing, and microarray analyses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **326**: 139–150.
- Lafontaine, D.L. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**: 11–19.
- Lahmy, S., Guilleminot, J., Cheng, C.M., Bechtold, N., Albert, S., Pelletier, G., Delseny, M., and Devic, M. (2004). DOMINO1, a member of a small plant-specific gene family, encodes a protein essential for nuclear and nucleolar functions. *Plant J.* **39**: 809–820.
- Lange, H., Sement, F.M., and Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **68**: 51–63.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., and Gibson, T.J., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Layat, E., Sáez-Vásquez, J., and Tourmente, S. (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 267–276.
- Lin, J., Lu, J., Feng, Y., Sun, M., and Ye, K. (2013). An RNA-binding complex involved in ribosome biogenesis contains a protein with homology to tRNA CCA-adding enzyme. *PLoS Biol.* **11**: e1001669.
- Liné, A., Stengrevics, A., Slucka, Z., Li, G., Jankevics, E., and Rees, R.C. (2002). Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *Br. J. Cancer* **86**: 1824–1830.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., and Chua, N.H. (2001). A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4782–4787.
- Ma, S., Bachan, S., Porto, M., Bohnert, H.J., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2012). Discovery of stress responsive DNA regulatory motifs in *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**: e43198.
- Maserati, M., Dai, X., Walentuk, M., and Mager, J. (2014). Identification of four genes required for mammalian blastocyst formation. *Zygote* **22**: 331–339.
- Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., Kojima, S., Ishibashi, N., Keta, S., Nakagawa, A., Hayashi, R., Saéz-Vásquez, J., Echeverria, M., Sugiyama, M., and Nakamura, K., et al. (2016). A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*. *Biol. Open* **5**: 942–954.
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., and Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of *Arabidopsis ARGONAUTE1*. *Sci. Rep.* **4**: 5533.
- Missbach, S., Weis, B.L., Martin, R., Simm, S., Bohnsack, M.T., and Schleiff, E. (2013). 40S ribosome biogenesis co-factors are essential for gametophyte and embryo development. *PLoS One* **8**: e54084.
- Montacié, C., Durut, N., Opsomer, A., Palm, D., Comella, P., Picart, C., Carpentier, M.C., Pontvianne, F., Carapito, C., Schleiff, E., and Sáez-Vásquez, J. (2017). Nucleolar Proteome Analysis and Proteasomal Activity Assays Reveal a Link between Nucleolus and 26S Proteasome in *A. thaliana*. *Front. Plant Sci.* **8**: 1815.
- Müller-Xing, R., Schubert, D., and Goodrich, J. (2015). Non-inductive conditions expose the cryptic bract of flower phytomers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **10**: e1010868.
- Murfett, J., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2001). Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* **13**: 1047–1061.
- Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Tuskan, G.A., Hellsten, U., Hayes, R.D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., Goodstein, D.M., and Dubchak, I., et al. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**: 356–362.
- O'Connor, T.R., Dyreson, C., and Wyrick, J.J. (2005). Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of *Arabidopsis* promoter sequences. *Bioinformatics* **21**: 4411–4413.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., Yamanaka, I., and Kiyosawa, H., et al.; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**: 563–573.
- Palm, D., Simm, S., Darm, K., Weis, B.L., Ruprecht, M., Schleiff, E., and Scharf, C. (2016). Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol.* **13**: 441–454.
- Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2006). The *Arabidopsis* SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *Plant Cell* **18**: 1590–1603.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., and Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet.* **25**: 368–376.
- Petracka, J.J., and Nelson, T.M. (2007). *Arabidopsis* nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* **144**: 173–186.
- Petrov, A.S., Bernier, C.R., Hsiao, C., Norris, A.M., Kovacs, N.A., Waterbury, C.C., Stepanov, V.G., Harvey, S.C., Fox, G.E., Wartell, R.M., Hud, N.V., and Williams, L.D. (2014). Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 10251–10256.
- Phipps, K.R., Charette, J., and Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**: 1–21.
- Pollock, C., and Huang, S. (2010). The perinucleolar compartment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a000679.
- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L. (1998). Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **14**: 497–501.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., and Sáez-Vásquez, J. (2007). Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus

- organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* **18**: 369–379.
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Cornella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., and Pikaard, C.S., et al.** (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **6**: e1001225.
- Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., Earley, K., Lawrence, R.J., Pikaard, C.S., Murfett, J., Furner, I., Vaucheret, H., and Mittelsten Scheid, O.** (2004). *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* **16**: 1021–1034.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (1999). OTC and *AUL1*, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 101–106.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **154**: 421–436.
- Robles, P., Fleury, D., Candela, H., Cnops, G., Alonso-Peral, M.M., Anami, S., Falcone, A., Caldana, C., Willmitzer, L., Ponce, M.R., Van Lijsebettens, M., and Micol, J.L.** (2010). The *RON1/FRY1/SAL1* gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1357–1372.
- Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y., and Warner, J.R.** (2007). Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 4815–4824.
- Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., and Ponce, M.R.** (2015). *Arabidopsis MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF- κ B activating protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing. *Plant Cell* **27**: 1999–2015.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* **131**: 16–26.
- Stothard, P.** (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**: 1102–, 1104.
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.L., Mullineux, S.T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D.L.** (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol. Cell* **51**: 539–551.
- Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2005). Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 757–766.
- Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N., and Lescure, B.** (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.* **20**: 553–561.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., and Shinozaki, K.** (2013). Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Signal.* **6**: rs8.
- Utama, B., Kennedy, D., Ru, K., and Mattick, J.S.** (2002). Isolation and characterization of a new nucleolar protein, Nrap, that is conserved from yeast to humans. *Genes Cells* **7**: 115–132.
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., and Van Montagu, M.** (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PFL* locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J.* **13**: 3378–3388.
- Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y.J., Van Oosten, M.J., Zhang, H., Tao, W.A., and Zhu, J.K.** (2013). Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: 11205–11210.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., and Schleiff, E.** (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends Plant Sci.* **20**: 729–740.
- Wilson, D.N., and Doudna Cate, J.H.** (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**: a011536.
- Woolford, J.L., Jr., and Baserga, S.J.** (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**: 643–681.
- Yu, C.P., Lin, J.J., and Li, W.H.** (2016). Positional distribution of transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **6**: 25164.
- Zakrzewska-Placzek, M., Souret, F.F., Sobczyk, G.J., Green, P.J., and Kufel, J.** (2010). *Arabidopsis thaliana* XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **38**: 4487–4502.
- Zhang, L., Hu, Y., Yan, S., Li, H., He, S., Huang, M., and Li, L.** (2012). ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Mol. Biol.* **79**: 285–293.
- Zhang, X.R., Qin, Z., Zhang, X., and Hu, Y.** (2015). *Arabidopsis* SMALL ORGAN 4, a homolog of yeast NOP53, regulates cell proliferation rate during organ growth. *J. Integr. Plant Biol.* **57**: 810–818.

Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 Is Required for 18S rRNA Maturation
Rosa Micol-Ponce, Raquel Sarmiento-Mañús, Alejandro Ruiz-Bayón, Charlotte Montacié, Julio

Sáez-Vasquez and María Rosa Ponce

Plant Cell 2018;30:2855-2872; originally published online October 25, 2018;
DOI 10.1105/tpc.18.00245

This information is current as of January 14, 2019

Supplemental Data	/content/suppl/2018/10/25/tpc.18.00245.DC1.html
References	This article cites 89 articles, 28 of which can be accessed free at: /content/30/11/2855.full.html#ref-list-1
Permissions	https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&issn=1532298X&WT.mc_id=pd_hw1532298X
eTOCs	Sign up for eTOCs at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
CiteTrack Alerts	Sign up for CiteTrack Alerts at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
Subscription Information	Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at: http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm

Annexe 2 : Article en préparation :

“Conserved and divergent functions of *Arabidopsis* SMALL ORGAN 4 in 45S pre-rRNA processing”

Conserved and divergent functions of Arabidopsis

SMALL ORGAN 4 in 45S pre-rRNA processing

Rosa Micol-Ponce¹, Raquel Sarmiento-Mañús¹, Charlotte Montacié², Julio Sáez-Vasquez³ and María Rosa Ponce¹

¹Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche,
03202 Elche, Alicante, Spain.

²CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, 66860,
Perpignan, France.

³Univ. Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes,
UMR 5096, 66860, Perpignan, France.

Running title: Arabidopsis SMO4 functions in 5.8S and 18S rRNA maturation

Corresponding author: María Rosa Ponce (mrponce@umh.es).

Character count, 52383; Word count (total), 9345; Word count excluding Title page, Supporting information legends, and References, 7241.

Word count breakdown: Title page, including Significance statement, 230; Significance statement, 74; Abstract, 225; Introduction, 674; Results, 2505; Discussion, 1982; Experimental procedures, 1339; Acknowledgements, Accession numbers, and Author contributions, 146; Tables, 0; Figure legends, 457; Supporting information legends, 180; References, 1683.

Figures: 5 Tables: 0 Supporting Figures: 11 Supporting Tables: 3
Supporting Datasets: 1

SIGNIFICANCE STATEMENT

Once thought by some to be a house-keeping function, ribosome biogenesis is now considered crucial for growth in multicellular eukaryotes, and is linked to human aging and diseases, including cancer. Hundreds of Arabidopsis genes are annotated as ribosome biogenesis factors (RBFs) based only on their evolutionary sequence conservation. Here, we provide experimental evidence for conserved and divergent functions of an Arabidopsis RBF, SMALL ORGAN 4, in the maturation of 5.8S and 18S ribosomal RNAs.

ABSTRACT

Ribosome biogenesis is crucial for cellular metabolism and has important implications for disease and aging. Nucleolar protein 53 (Nop53) and mRNA transport 4 (Mtr4) are ribosome biogenesis factors (RBFs) in yeast. Interaction between Nop53 and Mtr4 is required for 5.8S ribosomal RNA (rRNA) maturation. The conserved motifs that facilitate this interaction are also present in SMALL ORGAN 4 (SMO4) and MTR4, the Arabidopsis orthologs of Nop53 and Mtr4, respectively. *Arabidopsis MORPHOLOGY OF ARGONAUTE1-52 SUPPRESSED 2 (MAS2)* is required for 45S rDNA transcriptional regulation and 45S pre-rRNA processing. In a yeast two-hybrid screen, we found that SMO4 interacts with MAS2. In a genetic screen for *Arabidopsis* mutants with altered leaf shape, we identified *denticulata2 (den2)*, which we found to be an allele of *SMO4*. We observed *SMO4* coexpression with numerous genes encoding demonstrated or predicted RBFs, including *MTR4*. Mutation of *SMO4* resulted in accumulation of 5.8S and 18S rRNA precursors that are present in trace amounts in wild type, and nucleolar retention of 25S and 18S, but not 5.8S rRNA species. Double mutant analysis revealed that *smo4-3* synergistically interacts with *mas2-1* and *parl1-2*, an allele of *NUCLEOLIN1*, which encodes the NUC1 nucleolar RBF. These results show the role of SMO4 in ribosome biogenesis and confirm its interaction with MAS2. Like its yeast ortholog Nop53, SMO4 participates in 5.8S rRNA maturation; in contrast to Nop53, SMO4 also participates in 18S rRNA maturation.

Figure 4. Ribosome profiles of the *smo4* mutants.

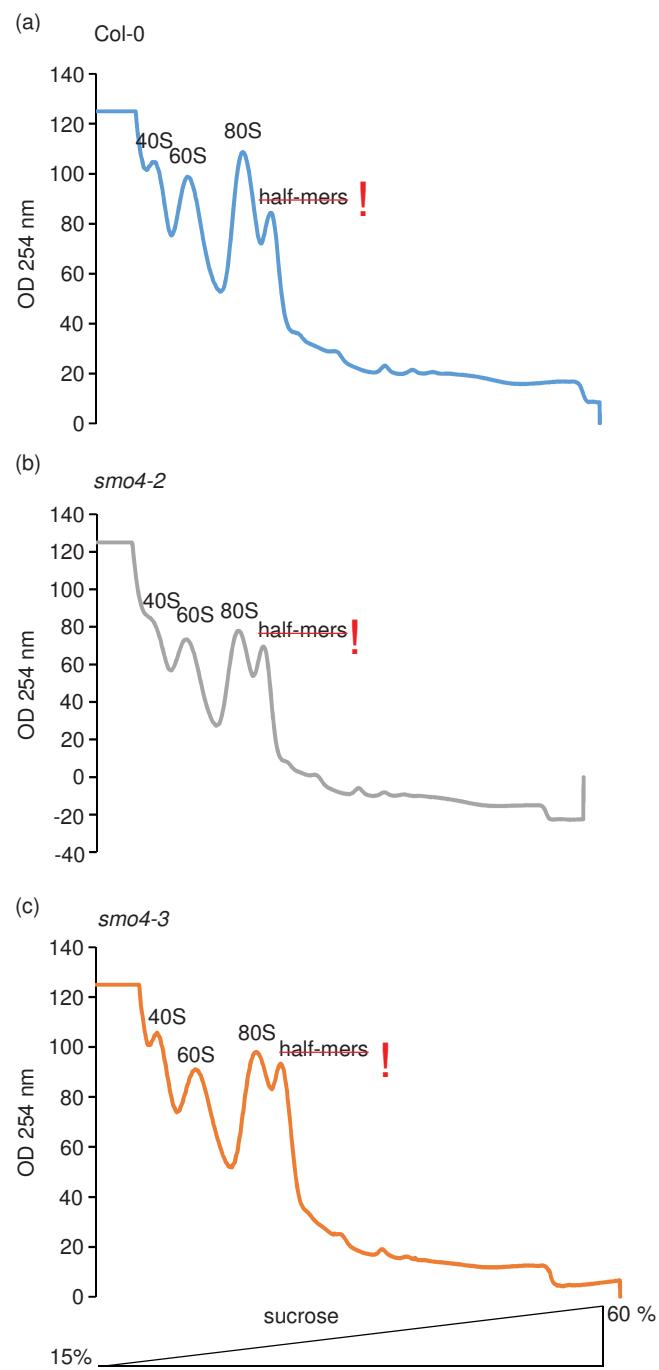
Extracts from aerial organs of plants collected at 18 das. Lysates were fractionated through 15–60% sucrose gradients by ultracentrifugation. Representative polysome profiles are shown from (a) Col-0, (b) *smo4*-2, and (c) *smo4*-3.

Ribosome profiling

Seeds were sown on Petri dishes containing 1X Murashige and Skoog medium with 1% sucrose, and stratified for 2 days. Plants were then grown under a 16-h light / 8-h dark cycle at 21°C for 18 days. Above-ground organs were collected 18 das, shock-frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Then, 250 mg of powder was resuspended in 750 µL of extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 9.0; 0.2 M KCl; 0.035 M MgCl₂; 0.025 M EGTA, pH 8.0) supplemented with 1% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich D6750); 1% detergent mix (detergent mix 10%: 5 g Brij-35; 5 mL Triton X100; 5 mL Igepal; 5 mL Tween 20); 2% polyoxyethylene 10 tridecyl ether; 5 mM DTT; 10 µM MG132; 50 µg·mL⁻¹ chloramphenicol; 100 µg·mL⁻¹ cycloheximide, and 100 µL enzymatic cocktail (Sigma-Aldrich P9599) for 10 mL of buffer. After 10 min incubation on ice, samples were centrifuged at 17,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant clarified using a 0.45 µm filter.

For ribosome profiling, 360 µL of clarified supernatant was layered onto a 9 mL linear 15-60% sucrose gradient. After centrifugation in a Beckman SW41 rotor at 38,000 rpm for 3 hours at 4°C, the gradient was analyzed using the Type 11 Optical Unit (Teledyne ISCO) attached to a UA-6 UV/VIS Detector (Teledyne ISCO) for continuous measurement of the absorbance at 254 nm. The assay was repeated up to 3 times with consistent results.

Micol-Ponce *et al.*, Figure 4



Résumé

Dans cette thèse, j'ai cherché à étudier l'impact du contenu et de la structure du nucléole sur les fonctions nucléolaires chez *A. thaliana*. Pour cela je me suis appuyée sur deux cas concrets : 1- J'ai réalisé le protéome du nucléole et caractérisé une de ces activités non-ribosomales / 2- J'ai étudié l'impact du fer nucléolaire dans la biogenèse des ribosomes.

D'une part, le protéome nucléolaire d'*A. thaliana* m'a permis d'identifier des protéines nucléolaires dont les fonctions connues sont extra-ribosomales. Ainsi j'ai démontré que l'activité du protéasome 26S peut être régulée par le nucléole. Plus précisément l'activité du protéasome diminue lors d'une déstructuration du nucléole. De plus, j'ai constaté que le protéasome 26S, conjointement avec la protéine Nucléoline, pourrait avoir un rôle dans la transcription et/ou la maturation des ARNr.

D'autre part, j'ai démontré que l'absence de fer nucléolaire (chez des plantes mutantes *nas1,2,4*) provoque une augmentation des structures nucléolaires propices à la transcription (les centres fibrillaires). Cette observation est corrélée à la transcription de l'ADNr du NOR2, normalement réprimé. Et, de manière inattendue, est liée avec l'hyperméthylation des promoteurs des ADNr en contexte CHH. Il se peut alors que le fer régule des facteurs impliqués dans les mécanismes épigénétiques responsables de la répression ou de l'activation des ADNr.

Abstract

The aim of this thesis work is to highlight the impact of both nucleolus content and structure on nucleolar functions in *A. thaliana*. For this I followed two approaches: 1- I performed nucleolus proteome and characterized one of its non-ribosomal activity / 2- I studied nucleolar iron impact on ribosomes biogenesis.

Firstly, the *A. thaliana* nucleolar proteome allowed me to identify nucleolar proteins with non-ribosomal functions. Among these, I showed that 26S proteasome activity can be regulated by nucleolus. More precisely, proteasome activity decreases with nucleolus disorganization. Moreover, I also showed that 26S proteasome, together with Nucleolin, might play a role in ribosomal RNA transcription and/or maturation.

Secondly, I proved that loss of nucleolar iron (in *nas1,2,4* mutant plants) induces an increase of nucleolar transcriptional structures (fibrillar centers). This observation is correlated with the transcription of normally silenced rDNA from NOR2 and, interestingly, with hypermethylation of rDNA promoters in CHH context. And so, iron might regulate factors implicated in epigenetic pathways responsible of either rDNA transcription or repression.