HAL
open science

Rôle du nucléole dans l'organisation nucléaire chez Arabidopsis thaliana

Frédéric Pontvianne

To cite this version:

Frédéric Pontvianne. Rôle du nucléole dans l'organisation nucléaire chez Arabidopsis thaliana. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Perpignan Via Domitia (UPVD), 2016. tel-02186748

HAL Id: tel-02186748

https://univ-perp.hal.science/tel-02186748

Submitted on 17 Jul 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.

Mémoire de Recherche

Pour obtenir le

Diplôme d'HABILITATION à DIRIGIER les RECHERCHES

de l'Université de Perpignan Via Domitia

Le 18 Mai 2016

Présenté par
Frédéric Pontvianne

Laboratoire Génome et Développement des Plantes
UMR5096 CNRS/UPVD

Membres du jury:

Président/Examinateur: Thierry Lagrange (DR CNRS, LGDP Perpignan)
Rapporteur: Dominique Gagliardi (DR CNRS, IBMP Strasbourg)
Rapporteur: Pierre-Emmanuel Gleizes (Professeur Université Paul Sabatier, Toulouse)
Rapporteur: Frédy Barnèche (CR CNRS, Institut de Biologie de l'ENS, Paris)
Examinatrice: Célia Jäger-Baroux (Group Leader, Institute of Plant Biology, Zürich)

I. Avant propos et remerciements 2
II. Curriculum vitae 4
III. Introduction 9
A. Structure et fonctions du nucléole 9
1. Le nucléole et la biogenèse des ribosomes 9
2. L'ultrastructure du nucléole reflète les étapes de biogenèse des ribosomes 9
3. Dynamique de la structure et biogenèse du nucléole 10
4. Les autres fonctions du nucléole : 11
B. Comment la position d'un gène dans le noyau influe sur son expression ? 14
1. La composition du noyau dans les cellules de plantes 14
2. L'organisation de la chromatine en 2D et son rôle dans la régulation transcriptionnelle 16
3. L'architecture nucléaire et l'organisation 3D du génome 16
4. Influence du positionnement d'un gène sur son expression chez *A. thaliana* 18
5. Stochasticité de la réponse cellulaire aux conditions environnementales changeantes : 18
IV. Activités de recherche de 2003 A 2012: 20
A. Travaux de thèse d'Octobre 2003 à Février 2007 20
B. Travaux du stage Postdoctoral réalisé au laboratoire de Craig S. Pikaard de Septembre 2009 à Juin 2011 22
C. Travaux du stage Postdoctoral réalisé au laboratoire d'Edouard Bertrand d'octobre 2011 à septembre 2012 25
V. Les fonctions nucléolaires dans des conditions environnementales changeantes 26
A. Du Fe dans le nucléole des cellules végétales 26
1. Impact du pool de Fe sur la biogenèse des ribosomes 26
2. Impact de la biogenèse des ribosomes et/ou de la structure du nucléole sur le pool de Fe nucléolaire 27
3. Travaux en cours et perspectives 28
B. Mise à jour du protéome nucléolaire 29
C. Lien entre le nucléole et le protéasome 29
D. Nucléole et stress thermique 31
E. Les petits ARN nucléolaires 32
VI. Régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire : une nouvelle voie de régulation des gènes ? 35
A. Le nucléole ne contient pas uniquement les gènes d'ARNr 35
B. Perspectives du projet NADs : 60
1. Régulation de la transcription par la séquestration nucléolaire: un mécanisme général pour réguler la transcription de certains gènes? 60
2. Détection des NADs au niveau cellulaire à l'aide de nouvelles méthodes de visualisation de gènes simple copie 63
3. Dynamique des NADs en cas de stress 65
VII. Conclusions générales: 68
VIII. Références 69
IX. Annexes 84

I. Avant propos et remerciements

En y incluant les études universitaires qui sont pour moi toujours sources d'inspirations, j'ai depuis maintenant 17 ans la chance de remplir mes journées et mon esprit de belles histoires qui oscillent entre la réalité et la fiction (Cela peut sembler provocateur d'intégrer la notion de fiction dans le domaine de la recherche, mais en sciences fondamentales, les hypothèses envisagées ne sont que rarement exactes). Evidemment, cette soif d'imaginer et de comprendre s'enracine dans mes souvenirs d'enfance. Si j'ai pu assouvir cette soif, c'est grâce à mes parents qui ont créé les conditions et indirectement ancrés cette volonté me permettant d'envisager cette carrière rêvée.

Le parcours de chacun est le résultat de dizaines/centaines de rencontres et d'interactions qui ont influé sur nos choix. Evidemment, certaines rencontres sont plus importantes que d'autres et peuvent créer des virages à 90 degrés. Parmi de nombreux exemples : à 20 ans j'étais parti pour une carrière dans l'agroalimentaire, en usine… puis après 3 mois et à quelques heures de signer un contrat stable, une discussion entre amis me fait reprendre mes études avec quelques jours de retard. Ou encore ce cours du professeur André Rode à Paris VI qui sera un déclic et se terminera par un stage à l'IBP avec Caroline Hartmann et Fabienne Corre-Menguy. La suite est dans le CV.

Evidemment, je tiens à remercier Julio Saez-Vasquez, mon mentor de thèse, qui m'a fait grandir dans ce milieu de la recherche, et qui a aussi été là pour me tenir la porte d'entrée du CNRS. J'ai également une pensée particulière pour Craig Pikaard et Edouard Bertrand qui m'ont accordé leur confiance et m'ont prodigué leurs conseils précieux pendant mes post-docs.

En ce qui concerne ce manuscrit, il me faut remercier Sylvie Lahmy qui a largement contribué au fait qu'il ne soit pas rempli de fautes d'orthographes. Merci aussi à Jacinthe Azévedo-Favory pour sa relecture.

Merci aux rapporteurs et examinateurs d'avoir accepté de prendre de leur temps pour juger ce rapport et mon parcours.

Puisqu'il serait trop long d'expliquer le pourquoi de chacun des remerciements, voici juste une liste qui peut paraître anonyme mais qui pour moi ne l'est pas.

Merci à Nico, Mehdi, Ed, Richard, Thierry, Dom, Sylvie, Natacha, Mahmoud, Christophe G, David, Manuel, Michel, Anne R, Todd, Andrzej, Jeremy, Tom, Chinnu, Ross, Olga, Pedro, Yannick, Wei, Céline, Eugénia, Marie-Cécile, Bérengère, Jonathan, Adrien, Houda, Marie, Nath D, Charlotte, Ariadna, Marie-Christine, Anne dB, Pascale, Sophie B, Christophe B, Christophe R, Jean-Phillipe, Jean-Marc, Olivier, Claire, Myriam F, Odile, Jean-René, Elizabeth, Julie, Sophie L, Cécile, Jean-Jacques, Viviane, Michèle, Christel, Eric, Nath P, Valérie, Jérémy, Véro, Laetitia, Aline, Frédy, Célia, Jiri, Véronika, Scott, Sylvette, Attila, Javier, Myriam BC, Mathieu, Antoine et ceux que je ne cite pas… MERCI pour votre aide technique, théorique, pratique ou scientifique… Merci pour votre patience, votre écoute et votre confiance, et merci pour votre bonne humeur.

A mes trois anges Anne, Lise et Elia…

II. Curriculum vitae

Frédéric Pontvianne
34 ans, marié, 2 enfants

Cursus universitaire

2007 **Doctorat dans le laboratoire Génome et Développement des Plantes (LGDP)**
UMR 5096 CNRS/UPVD/IRD, sous la tutelle de l'école doctorale Biologie intégrative de l'université Montpellier II et avec une bourse MENRT
Composition du jury : M. Olivier Gadal, M. Philippe Bouvet, M. Javier Fransisco-Medina, M. Saez-Vasquez, M. Michel Delseny et M. Pascal Gantet
Soutenue le 2 février 2007. Mention Très Honorable.

2003 **DEA** de Développement et Adaptation des Plantes : Biologie Moléculaire et Intégrative de l'université de Perpignan au LGDP.
Mention Bien (3ieme sur 17)

2002 **Maîtrise** en Biologie des Populations et des Ecosystèmes à l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI). Mention Assez Bien

2001 **Licence** eb Biologies des Organismes à l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

2000 **DUT** à l'IUT de biologie de Créteil (Université Paris XII), mention Assez Bien

Expériences Professionnelles en laboratoire:

2012 - **CR2 CNRS** au sein de l'équipe « nucléole et gènes d'ARNr » dirigée par M. Julio Saez-Vasquez au LGDP

2011-2012 **Stage Post-doctoral** dans le laboratoire du Dr Edouard Bertrand à l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (Montpellier, France).

2007-2011 **Stage Post-doctoral** dans le laboratoire du Dr Craig S. Pikaard à Washington University in Saint-Louis (MO, USA) de 2007 à 2009, puis à Indiana University in Bloomington (IN, USA) de 2009 à 2011.

2006-2007 **Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** à l'Université de Perpignan et au LGDP

2003-2006 **Thèse** sous la direction du Dr Julio Saez-Vasquez au LGDP (Perpignan, France).

2003 **Stage de DEA** (8 mois) au LGDP (Perpignan, France) sous la direction du Dr Julio Saez-Vasquez et du Dr Richard Cooke

Summer 2001 **Stage de Maîtrise** (2 mois) à l'Institut de Biotechnologie des Plantes (IBP, Orsay, France) sous la responsabilité de Fabienne Corre-Menguy

2000 **Stage de DUT** (3 mois) au Cork Institute of Technology (Cork, Ireland)

Subventions

2016-2019	**ANR JCJC NucleoReg**	229 000 Euros
2014	**BQR UPVD LANoS**	15 000 Euros

Activités d'expertises

Invited Reviewer to: Plant Physiol, Plant Journal, PLoS Genetics, PLoS One, Gene, Plant Cell Environment, Plant Mol Biol, Chromosoma, Protoplasma, Mol Biosyst and the National Agency ANR.

Guest Editor to : PLoS Genetics

Activités managériales

2015 - Membre du comité de pilotage de la plateforme technologique Tecnoviv de l'UPVD

2012 - Responsable scientifique de la plateforme d'imagerie Tecnoviv de l'UPVD.

Activités d'enseignement

2012 - Intervenant pour le module Epigénétique du Master 2 BFP (Université de Montpellier)

2006 – 2007 Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université de Perpignan (UPVD). 96 heures d'enseignements dispensés en DEUG et LICENCE en Biologie et Biochimie.

Activités d'encadrement et de formation par la recherche

2016 Responsable et encadrement du stage d'Ariadna Picart-picolo pendant 6 mois (**Master 2**, université Lyon Claude Bernard**)**

2015 - Co-directeur de thèse de Charlotte Montacié, codirigée par Julio Saez-Vasquez

2014 - **Membre du comité de thèse** de Laurianne Simon, en thèse au GReD (Clermont) sous la direction d'Aline Probst.

2014 - Encadrement d'Elodie Camy pendant 2 mois (**Master 1**, université de Perpignan)
- Encadrement de Veronika Muchova pendant 1 mois (**2nde année thèse**, Masaryk University, République Tchèque sous la direction de Jiri Fajkus)
- Encadrement de Tomasz Gulanicz et Agata Stepien pendant 1 semaine (respectivement en **1^{iere} et 3^{ieme} année de thèse** sous la direction de Artur Jarmolowski, Adam Mickiewicz University, Poznan, Pologne)

2013 - Encadrement de Nicolas Aussel pendant 2 mois (**master 1** Faculté de Pharmacie de Montpellier)
- Encadrement de Véronique Suréda pendant 1 mois (**BTS 2^{ieme} année,** Université d'Evry**)**

2010 - 11 Encadrement de Chinmayi Chandrasekhara pendant 18 mois (**master 2 et 1^{iere} année de thèse**, co-dirigée par Craig Pikaard à Indiana University, Bloomington, USA)

2010 Encadrement de Junzhou Wang pendant 6 mois (**master 2** Indiana University, Bloomington, USA)

2009 Encadrement de Brandon Lee pendant 3 mois (**master 1** Washington University in Saint-Louis , Mo, USA)

2006 Encadrement de Haijin XU pendant 3 mois (**master 1** Université de Perpignan)

2005 Encadrement de Chémy N'gong pendant 2 mois (**Licence 3^{ieme}** année Université de Perpignan)

2004 Encadrement de Nicolas Schlinger pendant 2 mois (**Licence 3^{ieme}** année université de Bordeaux II)

Activités de vulgarisation scientifique

2012 - Coordinateur d'un atelier de vulgarisation présenté aux villages des sciences à Perpignan (3 jours) et à Gérone (Espagne, 1 jour) et qui présente comment les plantes réagissent « rapidement » face aux contraintes de leur environnement.

2014 - Participe à un atelier de vulgarisation envers des jeunes défavorisés en relation avec l'association « Les Petits Débrouillards ».

2012 - Encadrement de collégiens (**3^{ieme}**) lors d'une semaine de stage pour découvrir le monde du travail

Bourses et distinctions

2011 - 2012 **Bourse « Advance post-doc » de la Ligue Nationale contre le Cancer**

2011 **The Innolec Award, Masaryk University (Czech Republic)**

2003 - 2006 **Bourse de thèse MENRT**

Conférences invités :

31 mars-1 avril 2016 Conférence annuelle du GDR3536 ADN « Architecture et Dynamique nucléaires ». *Paris, France*
Talk : Identification and function of Nucleolus-Associated chromatin Domains in *Arabidopsis thaliana*

Participation à des congrès :

14 – 15 Jan. 2016 Epigenetic & Chromatin Regulation of Plant Traits Conference. Strasbourg, France.
Short Talk and Poster : **Pontvianne F**, Carpentier MC, Durut N, Muchova V, Fajkus J and Saez-Vasquez J. Identification of Nucleolus-Associated Domains reveals an important role of the nucleolus in nuclear architecture and chromatin organization.

25 – 26 Juin 2015 4th European Workshop on Plant Chromatin, Upsalla, Sweden.
Talk : **Pontvianne F**, Carpentier MC, Pikaard CS, Saez-Vasquez J. Gene regulation by nucleolar sequestration : a new way to regulate gene transcription ?

16 – 17 Juin 2014	Conférence Chromatin Meets South, Montpellier, France. Talk : **Pontvianne F**, Carpentier MC, Pikaard CS, Saez-Vasquez J. Gene regulation by nucleolar sequestration in *Arabidopsis thaliana*.
23 – 28 Mars 2014	Keystone symposia on Chromatin Mechanisms and Cell Physiology, Oberstdorf, Germany. Poster : **Pontvianne F**, Lasserre E, Panaud O, Pikaard CS and Saez-Vasquez J. Nucleolus function in chromatin subnuclear organization: Identification of nucleolus associated domains in *Arabidopsis thaliana* leafs.
22 – 24 Nov. 2010	8ième congrès sifrARN de la SFBBM, Dourdan, France. Talk : **Pontvianne F**, Blevins T, Earley K, Lee B, Chandrasekhara C, Pikaard CS. Role of intergenic transcription and small RNAs directed DNA methylation in rRNA gene transcription in Arabidopsis.
25 – 30 Oct. 2009	9th International Congress on Plant Molecular Biology, Saint-Louis, Missouri, USA. Poster: **Pontvianne F**, Earley K, Wierzbicki AT, Blevins T, Costa-Nunes P, Preuss S, Tucker S and Pikaard C. Histone Deacetylase HDA6 suppresses intergenic transcription and mediates crosstalk between DNA methylation and histone modifications in rRNA gene silencing
10-13 Mai 2007	6th Symposium on Post-Transcriptional Regulation of Plant Gene Expression. *Carry-le-Rouet, France*. Poster*:* **Pontvianne F**, Matía I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, and Sáez-Vásquez J. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and plant development in Arabidopsis
16-20 Août 2006	The 7th Internationale Conference on Ribosome Synthesis. *Airlie Conference Center in Warrenton, Virginia, USA*. Poster*:* **Pontvianne F**, Matia I, Medina FJ, Echeverria M and Saez-Vasquez J. Nucleolin–like gene disruption in *A. thaliana* affects growth and plant development.

Séminaires invités :

13 Jan. 2016	Institut de Biologie Moléculaire des plantes (Strasbourg, France) par Todd Blevins
16 Oct. 2015	Zurich Botanical Institute (Zurich, Suisse) par Célia Baroux
24 Avril 2015	Adam Mickiewicz University (Poznan, Pologne) par Artur Jarmolowski
5 Sept. 2014	Laboratoire Génétique, Reproduction et Dévelopement (Clermont, France) par Aline Probst
29 Mai 2014	Indiana University in Bloomington (Indiana, USA) par Craig Pikaard
28 Mars 2014	Regensburg University (Regensburg, Germany) par Attila Németh
25 Oct. 2013	Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes (Toulouse, France) par Jérôme Cavaillé

27 Avril 2012	Laboratoire Génétique, Reproduction et Dévelopement (Clermont, France) par Sylvette Tourmente
7 Déc. 2011	Masaryk University (Brno, République Tchèque) par Jiri Fajkus
21 Juillet 2011	Institut de Génétique Humaine (Montpellier, France) par Jérôme Déjardin
26 nov. 2010	Institut de Recherche pour le Développement (Montpellier, France) par Daniel Grimanelli

Publications :

Nombre total de publications : 15

- 8 Publications en premier auteur
- 7 Publications en tant que co-auteur :
- Index Hirsch: 11
- Index i10: 11
- Facteurs d'Impact additionnés: 132,6

III. Introduction

A. Structure et fonctions du nucléole

1. Le nucléole et la biogenèse des ribosomes

Le nucléole est le compartiment du noyau le plus proéminent. Dès le XVIIIième, les premières observations au microscope optique de cellules ont permis d'identifier les noyaux comme des « corps oviformes, ayant une tâche dans son milieu » (Fontana 1781). Cette tâche correspond au nucléole, observé donc pour la première fois il y a près d'un quart de millénaire…

L'appellation « nucléole » (ou plutôt « nucleolus ») a quant à elle été introduite par Valentin en 1936. Evidemment, l'ensemble des travaux conduits à cette époque se contentaient de décrire ces corps, sans pour autant établir un lien avec une quelconque fonction. Un des premiers à observer un lien entre la taille des nucléoles et la « vitalité » des cellules n'est autre que Sigmund Freud, en 1881, alors qu'il termine ses études universitaires et s'apprête à développer une nouvelle discipline : la psychanalyse.

Le lien entre le nucléole et la biogenèse des ribosomes a été établi par d'autres scientifiques de renom. En 1931, le cytogénéticien Heitz décrit la présence d'une constriction secondaire sur certains chromosomes, différente du centromère, que Barbara McClintock corrèle avec le nucléole chez le maïs (Heitz 1931; McClintock 1934). Ainsi, c'est Barbara McClintock qui désigna ces constrictions secondaires sous le terme « NOR » pour « Nucleolus Organizer Region », sans pour autant connaître le contenu de cette région génomique. Le lien direct entre les NORs, la biogenèse des ribosomes et le nucléole a été clairement établi dans les années 60-70 (BROWN and GURDON 1964; RITOSSA and SPIEGELMAN 1965; Warner and Soeiro 1967). Plusieurs milliers de publications ont décrit depuis, de manière assez précise, les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes, qui commence par la transcription des gènes d'ARN ribosomiques (ANRr) par l'ARN polymerase I et finit par l'assemblage final des sous-unités ribosomiques 40S et 60S dans le cytoplasme. Entre les deux se déroule un nombre important d'évènements de clivages d'ARNr précurseurs, de modifications post-transcriptionnelles des ARNr, de modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques et d'assemblages. Les grandes étapes de ce processus sont décrites dans la Figure 1. Toutes ces étapes sont cruciales pour permettre de synthétiser des ribosomes fonctionnels et se déroulent dans un ordre précis mais pas nécessairement l'une après l'autre. Par exemple, des étapes d'assemblage, de clivage ou même de transcription peuvent avoir lieu simultanément (Granneman and Baserga 2005; Saez-Vasquez et al. 2004).

2. L'ultrastructure du nucléole reflète les étapes de biogenèse des ribosomes

Dès les premières études de la structure des nucléoles réalisées par microscopie électronique, l'existence de 3 compartiments majeurs a été mise à jour (Figure 2 (Derenzini et al. 1990; Risueno and Medina 1986)):

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

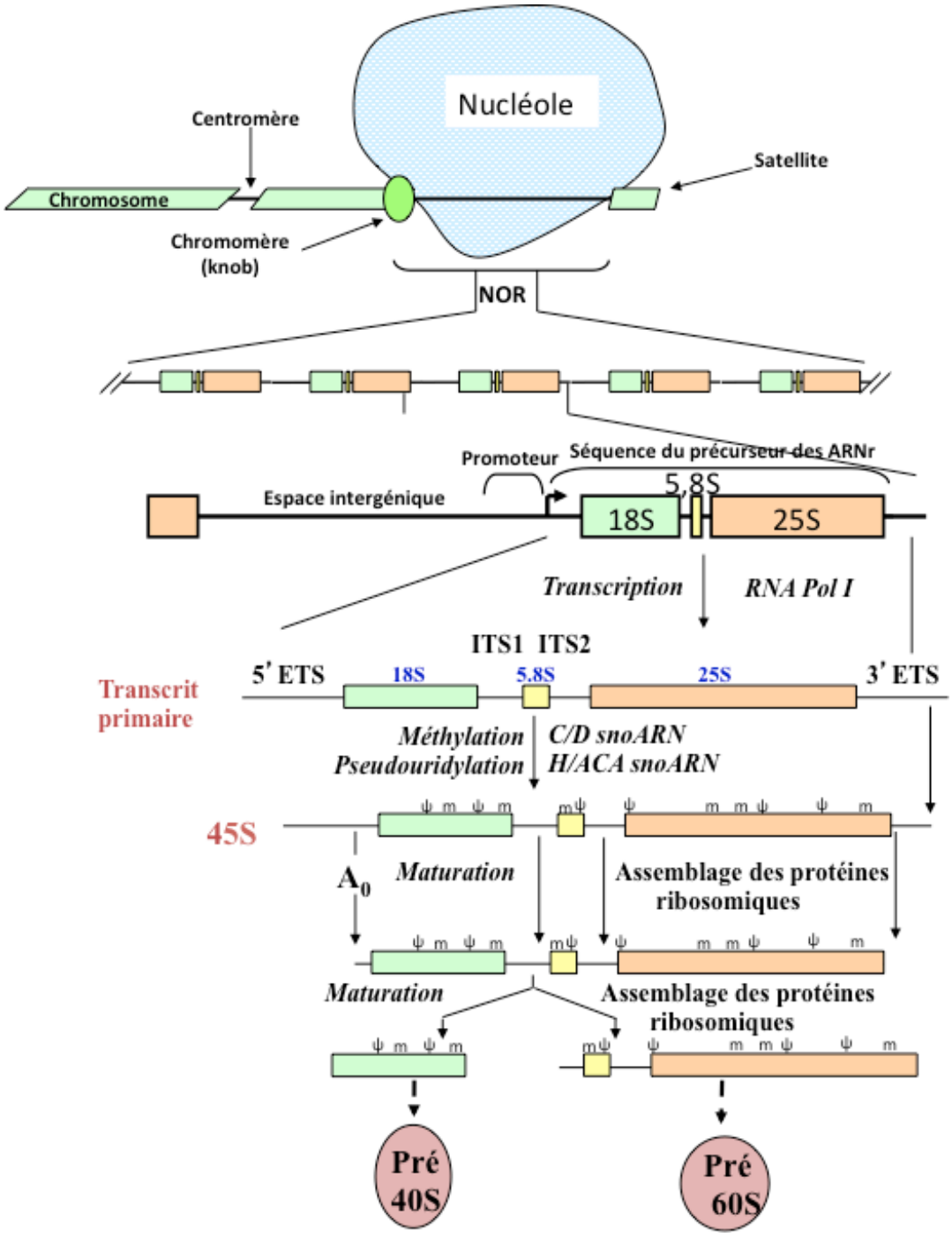


Figure 1: Etapes majeures de maturation et clivage des pré-ARNr 45S
Après transcription du pré-ARNr 45S au sein du nucléole par l'ARN pol I, les ARNr méthylés et pseudouridylés *via* des snoRNP guidés par des snoARN de type C/D pour la méthylation et de type H/ACA pour la pseudouridylation. En parallèle des étapes de clivage endo et exonucléotidiques sont réalisées grâce à l'intervention de plusieurs facteurs. Pendant la réalisation de ces étapes, les protéines ribosomiques s'associent peu à peu.

Chez la levure, la distinction entre le FC et le DFC n'est pas toujours évidente et on parle parfois de composés fibrillaires pour désigner l'ensemble. Chez de nombreuses espèces, essentiellement végétales, la présence d'un quatrième composant de très faible densité nommé « cavité nucléolaire » (ou vacuole) peut également être observé (Figure 2A-B).

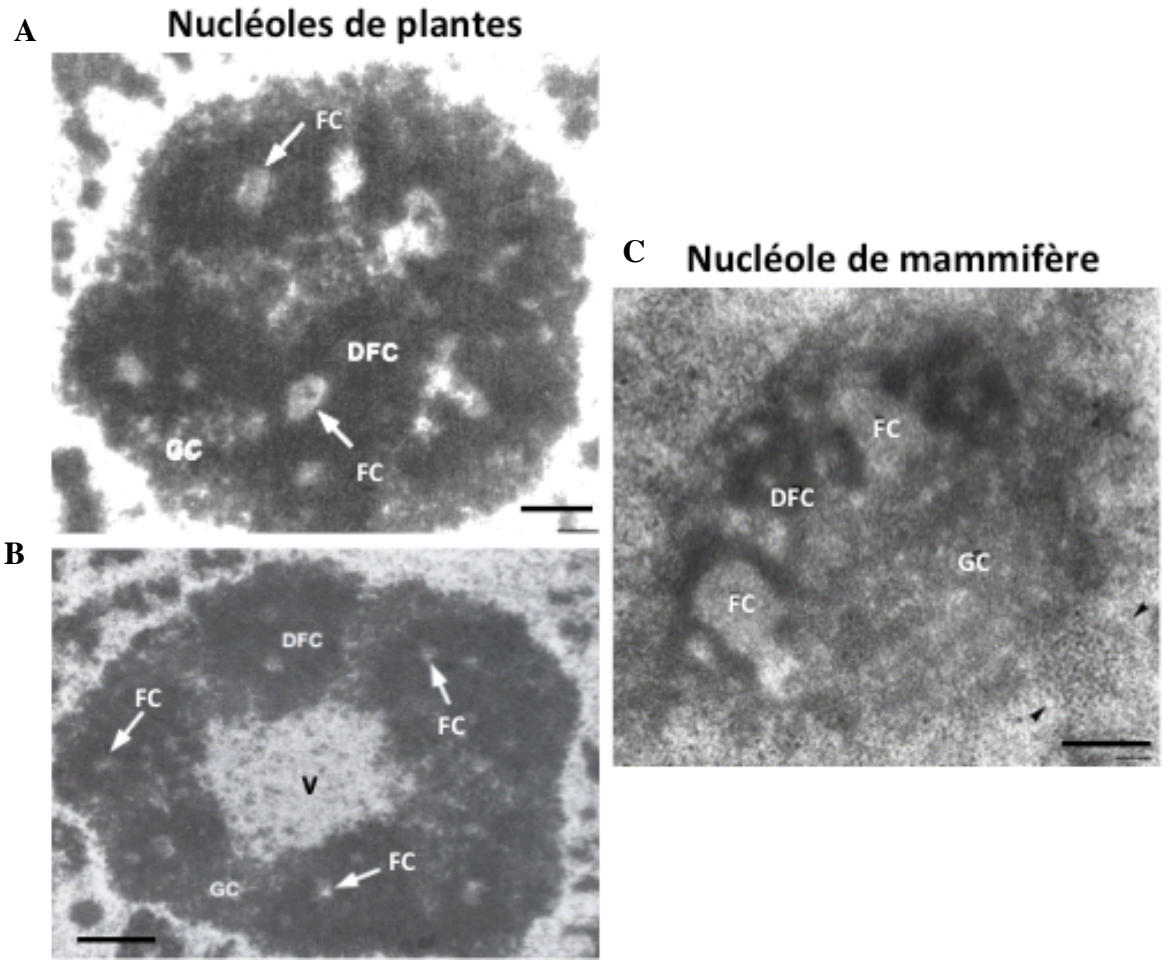
Ces trois compartiments sont organisés de manière concentrique non seulement au niveau structural, mais aussi au niveau fonctionnel (Figure 2D). Ainsi, l'ARN polymérase I transcrit les gènes d'ARNr entre la périphérie du FC et dans la zone interne du DFC (Falkan; Shaw and Jordan 1995; Thiry and Lafontaine 2005; Raska et al. 2006). Les évènements de maturation précoce ont pour leur part lieu dans le DFC et incluent de nombreuses modifications post-transcriptionnelles comme des évènements de clivages endo- et exo-nucléotidiques, de repliements, d'assemblages ou de modifications chimiques comme la méthylation ou la pseudouridylation (revue dans (Watkins and Bohnsack 2012)). D'autres évènements de clivages et d'assemblages plus tardifs ont lieu dans le GC où les structures granuleuses pourraient être dûes à l'accumulation de sous-unités pré-ribosomiques (Mosgoeller).

Le rôle de la cavité nucléolaire, souvent présente dans des cellules de racines possédant un large nucléole, reste assez mystérieux. Cette cavité nucléolaire est composée de nombreuses protéines également présentes dans le nucléoplasme, sans qu'un lien puisse pour autant être établi entre leur fonction et leur localisation intra-nucléolaire. Il est possible que certains facteurs y soient stockés avant d'être relargués dans le nucléoplasme si besoin. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une connexion entre le cytoplasme et la cavité nucléolaire a déjà pu être observée par microscopie électronique (Deltour and de Barsy 1985). Bien que le nucléoplasme et la cavité nucléolaire présentent une densité similaire, l'ADN génomique reste exclu dans cette dernière, démontrant ainsi que cette structure n'est pas la conséquence d'une formation en anneau du nucléole.

3. Dynamique de la structure et biogenèse du nucléole

Il est important de noter que le nucléole n'est pas délimité par une membrane et qu'il baigne directement dans le nucléoplasme. Sa densité et sa composition différente du nucléoplasme le fait apparaître pourtant comme une structure à part entière et facilement identifiable même sans marquage préalable des cellules. En outre, cette forte densité permet son isolement du reste du noyau par sonication sans affecter son intégrité, comme si une séparation physique permettait de « protéger » son contenu. Cette densité procure au nucléole des caractéristiques spécifiques vis à vis du nucléoplasme, leur permettant de se comporter comme deux phases non miscibles (Brangwynne et al. 2011).

La structure du nucléole est très dynamique et reflète son activité liée à la biogenèse des ribosomes. Par exemple, en cas de production faible ou importante de ribosomes, la part des structures FC, DFC et GC peut considérablement évoluer. Ainsi, les cellules lymphocytaires inactives possèdent un nucléole composé d'un grand FC entouré d'un DFC fin et d'un GC. Après activation des lymphocytes, la demande en ribosomes s'accroit rapidement et la structure du nucléole évolue en conséquence: le GC se réduit de manière importante (recrutement des pré-ribosomes contenus?), le FC se réduit et se divise alors que le DFC devient le composé dominant du nucléole avec le GC. En parallèle, la taille du nucléole augmente. Si la stimulation des lymphocytes s'arrête, le nucléole reprend une organisation de type peu active (Wachtler et al. 1980, 1990; Hozak et al. 1989). Cet exemple démontre que la structure du nucléole est dépendante de l'activité de biogenèse des ribosomes. D'ailleurs, lors de la division cellulaire, cette relation de dépendance est évidente puisque la transcription des



D. Organisation con fonctionnelle concentrique du nucléole

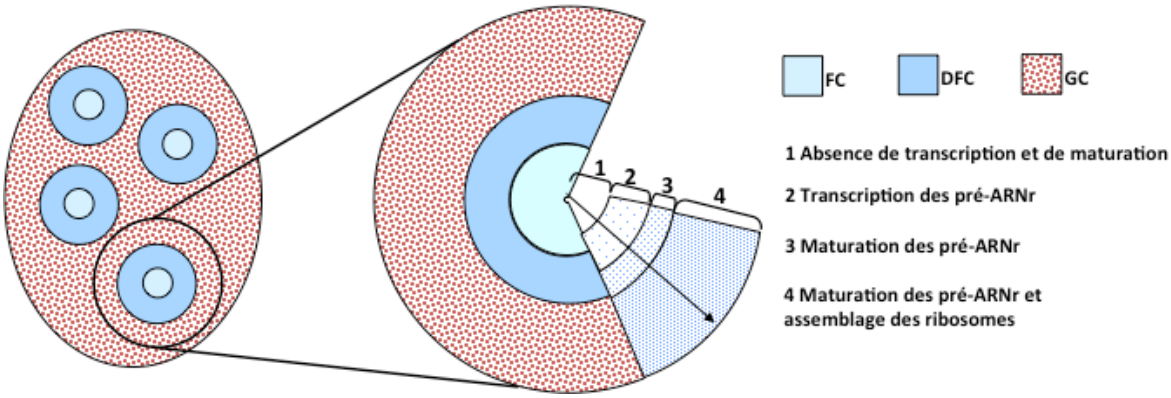


Figure 2 : Structure du nucléole

A-C. Photos prises au microscope électronique d'un nucléole de plante (oignon) non vacuolisé (A) ou vacuolisé (B), et d'un nucléole de cellule humaine (C). **D.** Schéma adapté de (De Carcer and Medina, 1999) représentant la structure et l'organisation fonctionnelle du nucléole chez la plupart des Eucaryotes. Structurellement, le centre fibrillaire (FC) est entouré du centre fibrillaire dense (DFC) qui est lui-même enveloppé par le centre granulaire (GC). Les 4 aires délimitées de 1 À 4 représentent les 4 zones fonctionnelles de cette organisation concentrique.

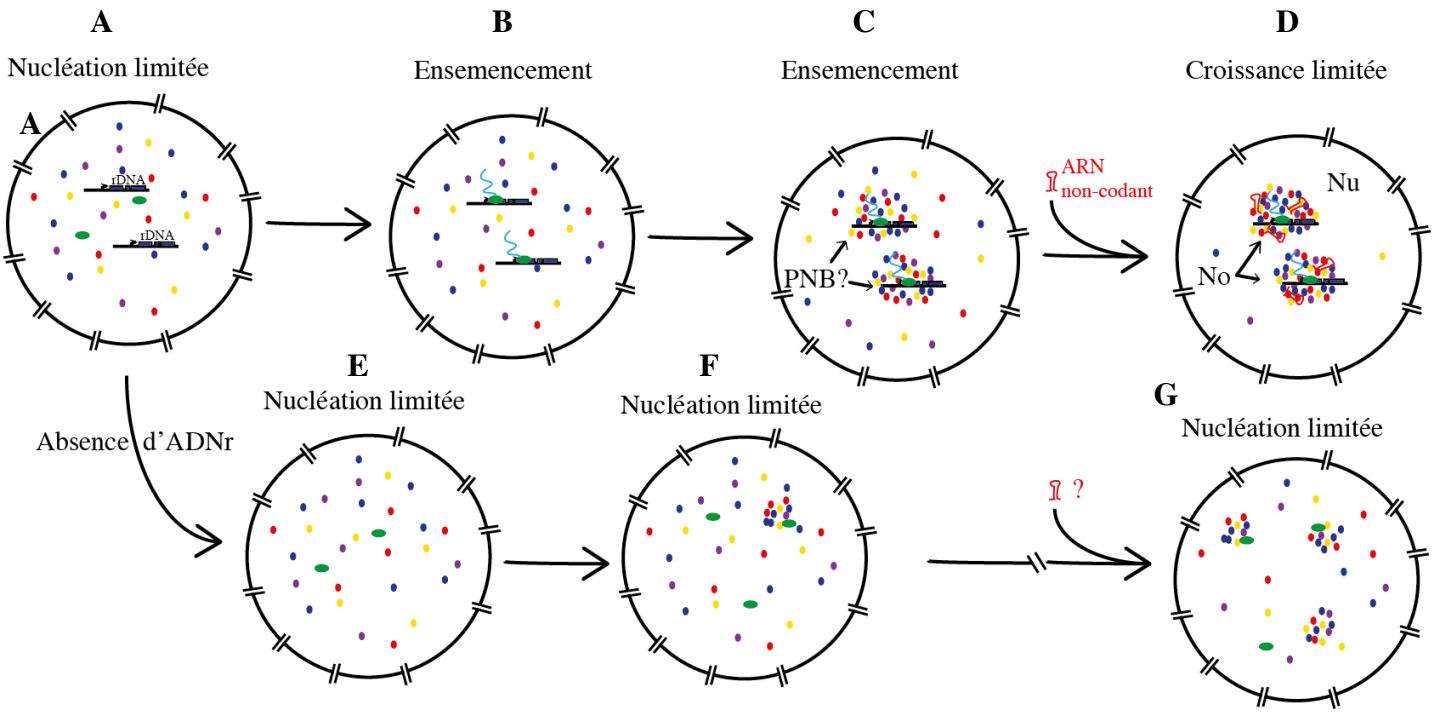


Figure 3 : Formation du nucléole
Schéma adapté de (Falahati et al., 2016) montrant les étapes de formation des nucléoles (A). La transcription des gènes d'ARNr précède la formation des nucléoles (B), d'abord en « pre-nucleolar bodies » (PNBs – C), puis en nucléoles matures (D). Dans ce cas, des ARN non-codants permettent de stabiliser la structure dense du nucléole. L'arrivée de ces ARN non-codants lors de la biogenèse des nucléoles n'est pas connue. En cas d'absence de gènes de transcription ou de gènes d'ARNr (E), la formation des nucléoles par l'agrégation des facteurs nucléolaires est limitée, (F) pour ne former au final que des agrégats très concentrés en protéines nucléolaires (G). Nous ne savons pas si ces agrégats contiennent les ARN non-codants structurants.

gènes d'ARNr se met en pause lors de la mitose (revue dans (Hernandez-Verdun 2011)). Le nucléole devient quasiment indétectable en prométaphase. Dès la sortie de mitose, l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I reprend, créant la formation de corps pré-nucléolaires où s'accumulent des facteurs impliqués dans la maturation des pré-ARNr (Ochs et al. 1983, 1985). Ces données montrent que les nucléoles se forment autour des gènes d'ARNr activement transcrits par l'ARN polymérase I.

Plus récemment, une série de travaux élégants ont permis de mettre en lumière l'importance des séquences et de la transcription. Pour cela, l'équipe de Brian McStay a réalisé l'insertion de 2 Mb de séquences intergéniques (IGS) d'ARNr issus du xénope dans le génome humain, créant ainsi des pseudo-NORs. Même s'ils ne possèdent pas véritablement de gènes d'ARNr, ces pseudo-NORs sont capables *in vivo* de recruter au sein de structures ressemblant au FC, l'ARN pol I, Upstream Binding Factor (UBF) et plusieurs autres facteurs impliqués dans la maturation précoce des gènes d'ARNr (Mais et al. 2005; Prieto and McStay 2007). Ces données suggèrent que la transcription n'est pas nécessaire pour recruter des facteurs impliqués lors de la formation du nucléole. Dans une autre expérience, en rendant ces pseudo-NORs actifs par l'addition, entre les régions IGS du xénope, de gènes d'ARNr issus de la souris, les pseudo-NORs se transforment en NORs activement transcrits, capables de former un nucléole synthétique (Grob et al. 2014).

Même en absence de gènes d'ARNr, de nombreuses protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes s'organisent en agrégats au sein du noyau (Figure 3 ; (Falahati et al. 2016)). Ces agrégats rappellent les « pré-nucleolar bodies » (PNBs) qui se forment dès la sortie de mitose (Hernandez-Verdun et al. 2002). Cependant, ces agrégats sont moins denses et plus nombreux que des nucléoles fonctionnels. Leur formation est également plus tardive, ce qui démontre que l'association des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes reste grandement facilitée par la transcription des gènes d'ARNr (Falahati et al. 2016).

D'autres travaux récents ont permis de prouver l'importance d'ARN non codants indépendants des gènes d'ARNr pour obtenir et maintenir des nucléoles très denses et d'assez grandes tailles (Figure 3). Au sein de cellules humaines, c'est l'ARN Alu qui semble jouer ce rôle structurant, via son interaction avec la Nucléoline (Caudron-Herger et al. 2015). Cet ARN non codant étant spécifique des primates, les auteurs de cette étude ont réussi à démontrer que l'ARN non codant B1 assumait ce rôle structurant chez la souris. Dans ces deux cas, les ARN non codants possèdent plusieurs structures tige-boucles organisées en deux bras pour l'ARN Alu, et un seul bras pour B1. L'origine de ces ARN, qui appartiennent à la famille des SINE, provient de l'évolution d'élements répandus chez les eucaryotes, l'ARN 7SL et les ARNt. Ainsi, la question reste ouverte sur la possibilité que d'autres ARN non codants dérivant par exemple d'ARNt ou 7SL ARN jouent un rôle équivalent chez d'autres eucaryotes.

4. Les autres fonctions du nucléole :

Nous venons de voir que la formation du nucléole est la conséquence de la biogenèse des ribosomes et que sa structure et son organisation sont intimement liées à cette fonction. Cependant, de nombreux exemples ont montré l'importance du nucléole comme une structure subnucléaire multifonctionnelle, intervenant lors de la régulation de la croissance cellulaire ou lors de la réponse aux stress. Le nucléole intervient ainsi lors du viellissement cellulaire, de la biogenèse du spliceosome, la dégradation de certains ARN ou encore la réponse au stress.

→ Le nucléole, les télomères et le vieillissement cellulaire:

Le raccourcissement des télomères est un des marqueurs du vieillissement cellulaire (Austriaco and Guarente 1997; Johnson et al. 1998). La contribution du nucléole à ce phénomène a notamment été montré dans les cellules humaines. Ainsi le composant ARN de la télomérase et cette dernière, impliqués dans la biologie des télomères, circulent toutes deux dans le nucléole en début de phase S du cycle cellulaire avant d'entamer la réplication des télomères (Tomlinson et al. 2006; Lee et al. 2014). Chez *Arabidopsis thaliana*, les télomères sont eux aussi regroupés au niveau du nucléole (Fransz et al. 2002; Armstrong et al. 2001). Une analyse de la localisation des télomères dans d'autres espèces de plantes serait nécessaire pour savoir s'il s'agit là d'une spécificité des cellules de plantes ou non. Toutefois, il est important de noter que la télomérase est également nucléolaire chez *A. thaliana*, tout comme la protéine TRB1 (Telomere Repeat Binding 1) qui interagit directement avec la télomérase dont la localisation est essentiellement nucléolaire (Zachova et al. 2013; Schrumpfova et al. 2014). Cette association nucléolaire n'est toutefois pas retrouvée chez de nombreux eucaryotes.

→ Le nucléole et la biogenèse du spliceosome:

Le spliceosome est le complexe snRNP intervenant dans l'épissage des ARNm (Sanford and Caceres 2004). Il est notamment composé des snRNA U1, U2, U4, U5 et U6 qui doivent tous subir des modifications post-transcriptionnelles de 2'-O-méthylation et de pseudouridylation au sein du nucléole pour être fonctionnelles (Gu et al. 1996; Ganot et al. 1999).

Par ailleurs, le complexe d'épissage nommé EJC (Exon Junction Complex) s'accumule dans le nucléole (Pendle et al. 2005). Il est probable que cette localisation permette l'assemblage correct de l'EJC ou bien qu'elle participe à sa régulation fonctionnelle.

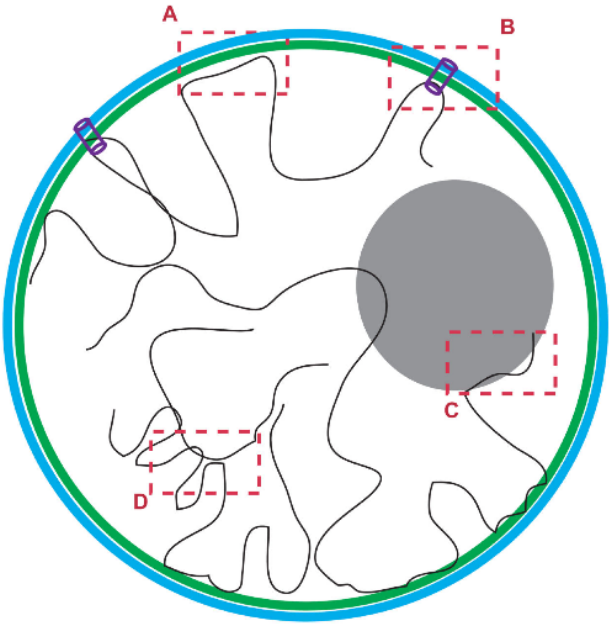
→ Le nucléole et la dégradation des ARN

Chez les eucaryotes et les archées, l'exosome constitue l'activité endonucléase majeure en 3' – 5', et ce pour une variété d'ARN incluant les ARNr, les sn(o) ARN, les ARN non codants et des ARNm (Houseley and Tollervey 2009; Tomecki and Dziembowski 2010). La composition de l'exosome et de ses cibles varient selon la localisation subcellulaire qui peut être cytoplasmique, nucléaire ou nucléolaire (Schneider and Tollervey 2013). Par exemple, il existe 3 protéines de type Rrp6 chez *A. thaliana*, possédant une localisation soit cytoplasmique (Rrp6L3), soit nucléoplasmique (Rrp6L1) soit nucléolaire (Rrp6L2) (Lange et al. 2008). Un exosome spécifique du nucléole existe donc bien et intervient lors de la dégradation de pré-ARNr (Lange et al. 2008; Sikorski et al. 2015). Chez la levure, dans des souches Δ*rrp6* ou Δ*mtr4,* des ARN polyadénylés s'accumulent dans le nucléole (Carneiro et al. 2007). La question est de savoir si seuls les ARNr ou des ARN impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont dégradés dans le nucléole ou si celui-ci est le lieu de dégradation d'autres types d'ARN (Lange et al. 2014). Une partie de la réponse est donnée par le séquençage des ARN nucléolaires, qui a permis non seulement d'identifier des ARNm, mais aussi de montrer qu'une partie d'entre eux étaient aberrants (Kim et al. 2009).

→ Le nucléole : senseur de stress (et d'éléments chimiques ?)

Plusieurs travaux ont pu montrer qu'en cas de stress, thermique par exemple, la structure des ribosomes, la structure et la composition des nucléoles étaient perturbées dans les cellules de mammifères. Une cascade de signalisation est alors déclenchée en réponse à ce

A. Organisation nucléaire



A. Membrane nucléaire interne

B. Proximité d'un pore nucléaire

C. Interactions intra et inter chromosomiques

D. Nucleolus

B. Interconnexion des LADs et des NADs dans les cellules humaines

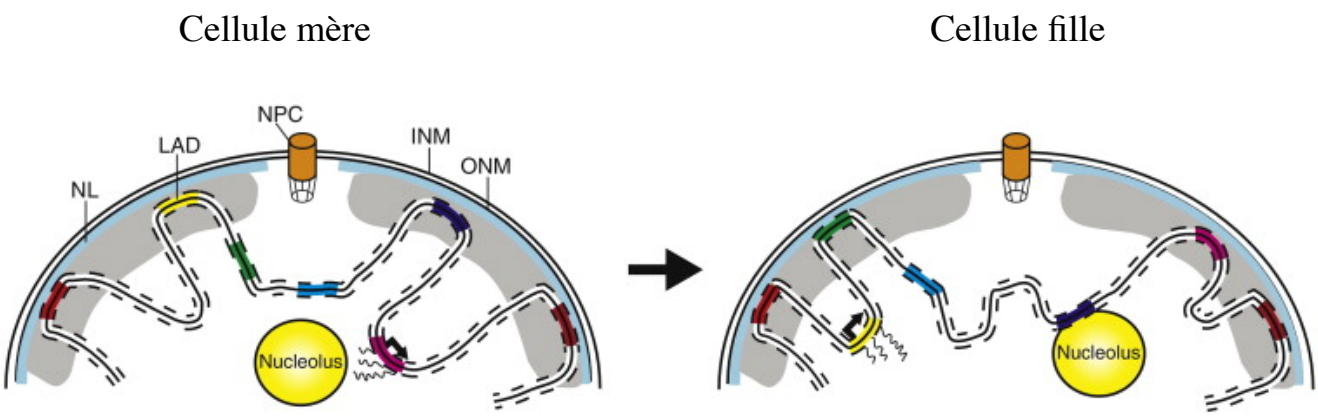


Figure 4: Distribution de la chromatine au sein de la cellule
A. Schéma tiré de (Van Steensel and Dekker, 2010) décrivant les différents types majeurs d'interactions ayant une influence sur la distribution de la chromatine au sein du noyau**. B.** Schéma tiré de Amendola and van Steensel, 2014) décrivant les interactions génome / lamine nucléaire (NL) lors de l'interphase. Les lignes hachurées représentent les contraintes physiques de la chromatine. Un microenvironnement distinct se forme autour des pores nucléaires (NPC). Après une mitose, les LADs sont réorganisés et peuvent devenir actifs dans le nucléoplasme, soit rester inactifs. Ils peuvent s'associer soit de nouveau avec la NL, soit avec le nucléole. INM = membrane nucléaire interne; ONM = membrane nucléaire externe.

stimulus (Boulon et al. 2010). Deux types de mécanismes ont été observés : (i) la séquestration de protéines au sein du nucléole via leur association à des ARN non codants provenant de la région intergénique (IGS) des gènes d'ARNr et accumulés lors de stress cellulaires (Audas et al. 2012; Mahata et al. 2012); (ii) la libération de protéines normalement nucléolaires dans le nucléoplasme où elles engendrent une cascade de réponses aux stress (Mahata et al. 2012). Ainsi, l'accumulation de transcrits IGS par des signaux environnementaux fonctionne comme un interrupteur moléculaire qui régule la structure et la fonction du nucléole (Jacob et al. 2013).

D'autres types de stress induisent une réorganisation de la structure et de la composition du nucléole. Lors d'un traitement de fibroblastes par un rayonnement UV, on observe une altération des complexes protéiques fonctionnels tels que le processome et l'exosome (Moore et al. 2011; Boisvert et al. 2007).

Toutefois, le lien entre le nucléole et certains éléments chimiques semble différent chez les cellules animales et végétales. Chez les mammifères, les noyaux de cellules saines contiennent des quantités à peine détectables de Fe. De façon inattendue, dans les cellules végétales, la concentration en Fe dans le nucléole est la plus élevée de tous les compartiments intracellulaires (Roschzttardtz et al. 2011). Le rôle de ce « pool » de Fe est encore inconnu, mais l'hypothèse actuellement privilégiée serait que le nucléole est capable de stocker et gérer la disponibilté du Fe et voire d'autres ions clés pour le développement des plantes afin de réguler le lien entre la biogenèse des ribosomes (qui fait partie des voie cellulaires les plus coûteuses en énergie) .

→ Rôle du nucléole dans l'organisation globale de la chromatine

En fonction des besoins cellulaires, la production en ribosomes est régulée de manière précise. Ainsi, le nombre de gènes activement transcrits s'associant au nucléole peut fortement varier, provoquant leur réorganisation au sein du noyau (Pontvianne et al. 2013). Chez la levure, la position relative vis-à-vis du nucléole de nombreux gènes influe sur leur niveau de transcription, notamment ceux codant pour les protéines ribosomiques par l'ARN pol II (Berger et al. 2008). Par ailleurs, le nucléole et le niveau de condensation des NOR ont un impact important dans l'architecture nucléaire, la formation de l'hétérochromatine et la transcription en général. Chez la drosophile et chez la levure, la taille des NOR influence l'ensemble de l'hétérochromatine nucléaire, ainsi que l'expression de nombreux gènes nucléaires (Paredes et al. 2011; Paredes and Maggert 2009; Ide et al. 2010).

Mais l'influence du nucléole ne s'arrête pas aux gènes d'ARNr. Le nucléole a également pour particularité d'être dépourvu d'ARN Pol II. Or, il a récemment été montré que les 23 chromosomes humains possédaient tous une de leur région associée ou présente dans le nucléole appelés NADs pour Nucleolus-Associated Domains (van Koningsbruggen et al. 2010; Nemeth et al. 2010). Si la raison de leur localisation nucléolaire reste mystérieuse, il est très probable que celle-ci affecte leur transcription (Nemeth and Langst 2011). Il est avéré que de larges portions du génome (les LADs pour Lamina-Associated Domains), généralement silencieuses, sont maintenues à la périphérie du noyau par un réseau de fibres composé notamment de lamine nucléaire (Guelen et al. 2008). Curieusement, il existe un certain chevauchement entre les LADs et les NADs, indiquant que l'hétérochromatine peut s'ancrer soit à la périphérie du noyau, soit à la périphérie du nucléole (figure 4 ; (Pombo and Dillon 2015)).

Plus récemment, l'analyse globale de l'organisation nucléaire en cas de stress thermique par la technique de Hi-C (analyse par séquençage haut débit des interactions intra et inter-chromosomes) a révélé l'apparition de corps Polycomb, composés de gènes réprimés, à l'intérieur du nucléole (Li et al. 2015). Toutes ces données indiquent un rôle du nucléole

non seulement dans l'organisation de la chromatine nucléaire, mais suggèrent aussi un rôle dans l'expression de gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

→ Le nucléole, passage obligé pour de nombreux virus

Beaucoup de protéines virales interagissent et/ou altèrent le nucléole. Elles peuvent provenir de virus à ARN, de rétrovirus et de virus à ADN (Hiscox 2007; Hiscox et al. 2010). Ces interactions avec le nucléole font entièrement partie de la stratégie infectieuse de ces virus. La localisation nucléolaire des protéines virales résulte dans la plupart des cas de leur interaction avec des gènes d'ARNr, des ARN nucléolaires (constitués principalement d'ARNr) ou des protéines nucléolaires (Wang et al. 2010; Scott et al. 2011; Carmo-Fonseca et al. 2000). Certains virus peuvent recruter des protéines nucléolaires pour aider à leur réplication.

Chez les plantes aussi existent plusieurs exemples de virus dont le cycle de multiplication passe nécessairement par le nucléole (Taliansky et al. 2010). Un motif de type NoLS (Nucleolar Localisation Signal) qui permet d'envoyer une protéine au nucléole est présent dans certaines protéines virales. Cette observation suggère que certains virus ont évolué pour cibler précisément le nucléole. Par ailleurs, plusieurs protéines nucléolaires comme la Fibrillarine, impliquée dans une des étapes précoces de la maturation des gènes d'ARNr, participe directement au cycle de réplication des virus (Kim et al. 2007a, 2007b; Rajamaki and Valkonen 2009). Puisque le nucléole offre un espace où sont présents de nombreux facteurs impliqués dans des étapes très variées de maturation des ARN, les virus et viroïdes qui transitent dans le nucléole ont ainsi accès à une véritable boîte à outils pour maturer leurs propres ARN.

B. Comment la position d'un gène dans le noyau influe sur son expression ?

1. La composition du noyau dans les cellules de plantes

L'environnement nucléaire des gènes joue un rôle primordial dans l'expression de ceux-ci. Le noyau est en effet composé non seulement de la chromatine, mais également de nombreux corps nucléaires. Outre le nucléole qui représente de loin le corps nucléaire le plus volumineux, il en existe d'autres qui ont tous la particularité de ne pas posséder de membrane les séparant physiquement du nucléoplasme. Parmi ces corps on retrouve essentiellement les corps de Cajal, les Dicing bodies, les speackles nucléaires et les photobodies.

→ Les corps de Cajal sont impliqués dans la maturation et le transport de snRNPs et de snoRNPs (Gall 2003; Sleeman et al. 2001). La mutation de la Coïline, composant spécifique des corps de Cajal, empêche la mise en place de ces corps nucléaires (Collier et al. 2006). Cependant, par l'étude de mutants, on a pu démontrer que l'absence de corps de Cajal, chez la plante *A. thaliana* n'effecte pas la viabilité et n'entraine aucun phénotype visible en conditions standards de croissance (Collier et al. 2006).

D'autres travaux ont identifié dans le corps de Cajal de nombreux facteurs de la voie de répression transcriptionnelle guidée par les petits ARN (RdDM), ainsi que des membres d'autres voies de répression (Pontes et al. 2013; Li et al. 2006; Pontes et al. 2006). Au sein de la cellule, les corps de Cajal peuvent être liés au nucléole ou

« libres ». De manière intéressante, seuls les corps de Cajal liés au nucléole accumulent ces facteurs du RdDM (Pontes and Pikaard 2008). Par ailleurs, il a été montré que certains corps de Cajal peuvent fusionner avec le nucléole (Boudonck et al. 1999). Cependant, dans les mutants *coïline*, l'association des facteurs du RdDM avec un corps très proche du nucléole n'est que peu altérée (Pontes et al. 2013). Ces données suggèrent l'existence d'un type spécifique de corps de Cajal, peut-être liés à la biogenèse ou au stockage de facteurs impliqués dans les voies de répression transcriptionnelle, et qui est systématiquement lié au nucléole. Par ailleurs, les Dicing bodies sont composés de facteurs impliqués dans la biogenèse des microRNA (Fang and Spector 2007). Ce sont des corps associés au nucléole. La nomenclature n'a pas encore tranché entre dicing bodies ou Cajal bodies, mais il apparaît que ces corps possèdent plusieurs constituants qui étaient préalablement décrits comme spécifiques des corps de Cajal.

→ Les speackles nucléaires sont composés de nombreux facteurs d'épissage et se localisent dans le nucléoplasme, souvent près des sites de transcription de l'ARN Pol II (Fang et al. 2004; Spector and Lamond 2011).

→ Les photobodies sont des corps que l'on peut observer lors de la photomorphogenèse. A l'obscurité, les phytochromes rouges et rouges lointains sont cytoplasmiques, mais deviennent nucléaires après 1-2min d'exposition à la lumière et forment des photobodies où sont également présents PhyA (de manière transitoire) et PhyB (le phytochrome majeur) (Yamaguchi et al. 1999; Sakamoto and Nagatani 1996). La spectre de la lumière agit alors directement sur le nombre et la taille des photobodies (Chen et al. 2003, 2010; Van Buskirk et al. 2012). Ces corps se composent également de facteurs de transcription impliqués dans la photoactivation, mais aussi de leurs régulateurs comme la E3 ligase Constitutively Photomorphogenic 1 (COP1) (Liu et al. 2014).

D'autres corps nucléaires ont été identifiés dans les noyaux des cellules animales et sont bien décrits dans la revue (Mao et al. 2011). C'est par exemple le cas des domaines Polycombs qui regroupent des gènes réprimés par les Polycomb-Repressive Complexes (PRC). Ceux-ci peuvent former des corps nucléaires de taille importante dans le cas de la répression des gènes Hox ou lors de l'inactivation du chromosome X (Heard and Bickmore 2007; Pollex and Heard 2012; Bantignies et al. 2011).

C'est également le cas des usines de transcription pol II qui sont des agrégats où sont préférentiellement accumulés les complexes ARN pol II au sein du nucléoplasme. Les modèles actuels de la transcription montrent le plus souvent une ARN pol II se déplaçant le long d'une matrice ADN. Une alternative possible à ce modèle serait que les ARN polymérases soient attachées à des structures plus importantes et que ce soit l'ADN matrice qui se déplace pour permettre sa transcription (Cook 1999; Papantonis and Cook 2013). Cependant, même si plusieurs travaux convergent dans ce sens, les avancées récentes en microscopie superrésolutive semblent indiquer d'une part que dans 70% des cas, les ARN pol II sont « libres» dans le nucléoplasme (Zhao et al. 2014) et d'autre part que même si en effet plusieurs ARN pol II peuvent s'agréger, leur association reste très transitoire (autour de 5 sec en moyenne), et donc trop courte pour permettre la transcription de la plupart des gènes (Cisse et al. 2013).

Une connaissance de la position et de la fonction de l'ensemble de ces corps nucléaires reste essentielle, la position d'un gène vis-à-vis de ces corps pourrait en effet influer sur la régulation de son expression.

2. L'organisation de la chromatine en 2D et son rôle dans la régulation transcriptionnelle

De la transcription d'un gène dépend toute une succession d'étapes comme autant de possibilités de régulation. Parmi les différents niveaux de régulation qui affectent la transcription des gènes, l'organisation locale de la chromatine est l'un des plus importants. Cette chromatine se compose de l'ADN génomique nucléaire enroulé de manière cyclique à des octamères d'histones (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4) nommés nucléosomes (Luger and Richmond 1998). L'impact des modifications post-traductionnelles de la région N-terminale des histones sur le niveau de condensation de la chromatine et la régulation transcriptionnelle est aujourd'hui largement reconnu chez tous les eucaryotes (Kouzarides 2007). Chez les plantes et les mammifères, la méthylation des cytosines est également très importante dans la régulation du niveau de condensation de la chromatine et la régulation transcriptionnelle. Enfin, la cartographie génomique systématique de l'ensemble de ces modifications, les variants d'histones et du positionnement de certains facteurs de transcription a permis d'établir plusieurs types de chromatines dans les cellules animales et végétales (Filion et al. 2010; Kharchenko et al. 2011; Roudier et al. 2011; Sequeira-Mendes et al. 2014).

Chez *Arabidopsis thaliana*, cette cartographie a permis de mettre en évidence entre 4 et 9 états de la chromatine (Sequeira-Mendes et al. 2014; Roudier et al. 2011). Cette organisation est très dynamique et peut évoluer selon le type cellulaire étudié ou selon l'environnement de la plante (chaleur, lumière, …) (Bourbousse et al. 2015; Sullivan et al. 2014). Toutes ces modifications agissent sur l'accessibilité des régions régulatrices des gènes et ainsi leur capacité à être transcrites par l'ARN polymérase. Ces modifications sont réalisées par un grand nombre de facteurs (ARN et/ou protéines) qui peuvent agir sur la méthylation de l'ADN, ainsi que modifier chimiquement de nombreux résidus d'histones. Ces voies sont particulièrement développées chez les plantes où deux autres ARN polymérases (ARN pol IV et V) ont spécifiquement évolué de l'ARN pol II pour réaliser une partie de ces modifications (Pikaard and Mittelsten Scheid 2014).

Cette cartographie systématique de la chromatine permet d'avoir une vision précise de l'environnement direct, en semi-2D, des gènes. Cette vision n'est cependant pas suffisante pour connaître le contexte réel des gènes et de leur environnement au sein de la cellule, dans un contexte *in vivo* et en 3D.

3. L'architecture nucléaire et l'organisation 3D du génome

Pour passer de l'organisation semi-2D correspondant à la chromatine décrite de manière linéaire, à celle tridimensionnelle du génome dans le noyau, il faut prendre en compte la position d'une région du génome vis à vis de tous les composants présents dans le noyau (Figure 4A).

(i) Proximité avec un corps nucléaire :

Nous avons vu précédemment que certaines régions chromosomiques (les NADs) s'associent au nucléole et que ces régions sont essentiellement composées d'hétérochromatine ou de gènes peu (ou pas) transcrits (Nemeth and Langst 2011). Du fait de l'absence de l'ARN pol II au sein du nucléole, il est fort possible que cette association de certains gènes avec le nucléole puisse avoir des conséquences directes sur leur régulation transcriptionnelle. Nous aurons tout au long de ce manuscrit l'opportunité de discuter de cette hypothèse. Dans le paragraphe précédent, nous avons détaillé le rôle de

certains corps nucléaires possédant des fonctions dans la biogenèse de RNP ou dans l'épissage par exemple. Un gène activement transcrit va nécessairement passer par des étapes de transcription et d'épissage. Le voisinage relatif avec un speackle nucléaire ou une ARN pol II pourra avoir un impact sur les étapes de son expression.

(ii) Proximité avec un pore nucléaire :
Chez la levure et dans les cellules de mammifères, certains gènes très transcrits co-localisent avec un pore nucléaire. Cette association est supposée améliorer l'efficacité de production des ARN en diminuant le temps nécessaire à leur exportation dans le cytoplasme (Casolari et al. 2004; Dieppois and Stutz 2010; Taddei et al. 2006). Si la composition des pores nucléaires commence à être bien caractérisée chez les plantes, une telle corrélation n'a pu être mise en évidence pour le moment (Parry 2014; Tamura et al. 2010).

(iii) Association avec la périphérie nucléaire :
Dans les cellules de mammifères sont organisées à la périphérie du noyau un réseau de fibres de lamines. Une partie non négligeable du génome est associée à ce réseau. Ces régions génomiques sont nommées LADs pour Lamina-Associated Domains et sont essentiellement composées de chromatine répressive à la transcription (Guelen et al. 2008; Filion et al. 2010). A l'échelle de la population de cellules, les LADs représentent environ 35% du génome, mais à l'échelle cellulaire, seulement un tiers des LADs est effectivement positionné à la périphérie du noyau (Kind et al. 2015). Le positionnement nucléaire des LADs est très dynamique et ceux-ci sont remaniés de manière stochastique lors de la mitose (Figure 4B). Des approches de biologie cellulaire ont permis de montrer qu'une partie importante des LADs qui se délocalisent peuvent devenir des NADs, indiquant que la périphérie nucléaire et le nucléole jouent un rôle similaire dans l'organisation nucléaire de l'hétérochromatine (Kind et al. 2013; Bickmore and van Steensel 2013).

Cependant, dans les cellules végétales, les gènes codant des protéines homologues à la lamine nucléaire n'ont pas pu être identifiés. Des protéines végétales LINC (Little Nuclei, appelée aussi CRWN) partagent néanmoins certaines caractéristiques avec les lamines, y compris des domaines coiled-coil (Dittmer et al. 2007). La composition du complexe LINC a récemment été réalisée chez les plantes (Graumann and Evans 2010, 2011; Tatout et al. 2014). Si le lien entre ce complexe et la chromatine n'est pas établi les données obtenues dans les cellules animales le suggèrent fortement.

(iv) Interactions inter et intra chromosomiques :
La technique de « Chromosome Conformation Capture » (3C) consiste à identifier les régions génomiques très proches au sein d'un noyau par une approche de type digestion/ligation (Dekker et al. 2002). Associée au séquençage haut-débit, elle permet de connaître l'ensemble des interactions intra et inter-chromosomiques au sein d'une cellule, et se nomme Hi-C (Belton et al. 2012). Ces interactions peuvent-être directes (ADN / ADN) ou indirectes (ADN / protéines / ADN; ADN / ARN / ADN ; etc…). Cette approche a ainsi permis de révéler l'existence de domaines topologiquement associés (TADs), correspondant à des regroupements de régions génomiques ayant des

signatures communes de la chromatine et plus ou moins isolées des autres (Sexton et al. 2012).

Chez les plantes, les techniques de 3C et de Hi-C ont également permis de révéler l'existence de ces regroupements en domaines fonctionnels (Wang et al. 2015). Ces approches de HiC ont été réalisées sur un pool de cellules végétales provenant de plantules d'*A. thaliana* de 15 jours, mais n'ont pas permis de définir aussi précisément une organisation en TADs. Cependant, une différence majeure existe entre ces approches puisque des cellules en culture ont été utilisées dans les études menées chez les modèles animaux (mammifères et drosophile), tandis qu'il s'agissait d'une population hétérogène de cellules dans le cas des plantes. On sait que l'organisation nucléaire du génome au sein du noyau peut être très variable selon le type cellulaire, l'étude en Hi-C d'un type cellulaire (ou d'une cellule unique) serait donc plus adaptée.

Une des différences majeures qui existe chez *Arabidopsis thaliana* est l'absence de réels territoires chromosomiques (Pecinka et al. 2004), tandis que ces territoires sont assez bien définis et stables dans les cellules humaines (Speicher and Carter 2005). Les chromosomes possédant des gènes d'ARNr sont toutefois l'exception, car les chromosomes 2 et 4 sont plus souvent associés l'un à l'autre que la moyenne (Pecinka et al. 2004).

4. Influence du positionnement d'un gène sur son expression chez *A. thaliana*

L'organisation nucléaire, à savoir la répartition de la chromatine et sa condensation dans le noyau, est modifiée lors de différentes phases du développement telles que la germination (Mathieu et al. 2003), la transition florale (Tessadori et al. 2007) et la maturation des graines (van Zanten et al. 2011, 2012). Les variations d'intensité lumineuse ont également un impact direct sur le niveau de compaction de la chromatine à l'échelle nucléaire (Tessadori et al. 2009; van Zanten et al. 2012). Ces changements de l'organisation nucléaire ont surtout été étudiés à l'échelle du noyau, dans des préparations de noyaux colorés au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Plus récemment, deux études ont démontré que cette réorganisation nucléaire affecte le positionnement de certains gènes clés lorsqu'ils évoluent d'un état actif (ON) à inactif (OFF) ou inversement. Dans le premier exemple, le gène de la chlorophylle a/b inductible par la lumière (CAB) se déplace de l'intérieur du noyau à la périphérie nucléaire lors de son activation transcriptionnelle induite par la lumière (Feng et al. 2014a). Dans le second exemple, la répression transcriptionnelle induite par le froid du locus FLOWERING LOCUS C (FLC) conduit au regroupement des deux loci FLC (Rosa et al. 2013). Ces deux exemples montrent clairement l'impact des signaux externes sur l'expression et le positionnement de certains gènes. Dans les deux cas, les réponses concernent deux voies qui permettent à la plante de répondre aux changements de son environnement. Ils ne représentent certainement que le sommet de l'iceberg, car il est sûr que plusieurs dizaines voire centaines de gènes sont exprimés différentiellement en cas de stress biotiques ou abiotiques.

5. Stochasticité de la réponse cellulaire aux conditions environnementales changeantes :

Au sein d'un même tissu sont présents plusieurs types cellulaires possédant chacun des caractéristiques qui lui sont propres. Ainsi, en cas de stress, deux types de réponses se

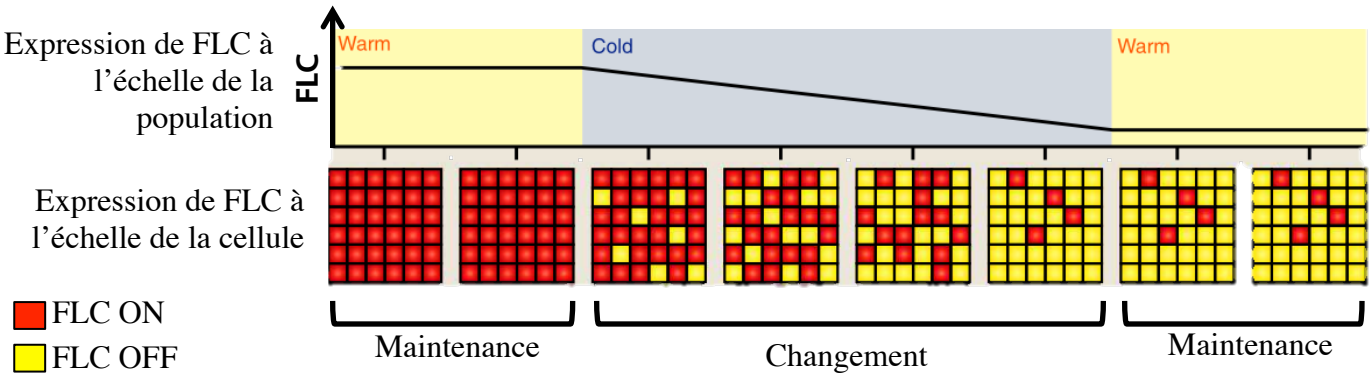


Figure 5: Répression graduelle de FLC lors de la vernalistion
Schéma tiré de (Berry and Dean, 2015). L'expression de FLC est graduellement réprimée lors de la vernalisation à l'échelle du tissu ou de la plante. Cependant, à l'échelle cellulaire, cette répression correspond à une diminution graduelle de la proportion des cellules où le gène FLC est exprimé.

chevauchent : une réponse commune à tous les types cellulaires et une réponse spécifique à chaque type cellulaire. Dans ce contexte, l'étude globale des modifications de la chromatine, du transcriptome, du translatome ou du protéome au sein d'une plante ou d'un tissu permettent d'identifier la réponse commune à une majorité de cellules, mais ne permet pas d'appréhender les variations spécifiques des certains types cellulaires. Une caractérisation précise de chaque type cellulaire permet cependant une bien meilleure compréhension des mécanismes de défense et d'adaptation des plantes (Mustroph et al. 2009; Dinneny et al. 2008).

Un des plus important challenge pour les études à venir est la prise en compte à l'échelle de la cellule de la réponse aux conditions environnementales changeantes, tout en restant dans le contexte d'un organisme entier et vivant. En d'autres termes, comment chaque cellule modifie son propre transcriptome en réponse à des changements dans l'environnement et comment ces modifications sont repercutées dans toute la plante. Il existe bien sûr une communication intercellulaire importante, réalisée par des gradients de plusieurs phytohormones comme l'auxine ou la cytokinine. Leur action est primordiale pour le développement spatio-temporel des différents organes végétaux (ten Hove et al. 2015). Cependant, en cas de stress thermique, chaque cellule semble répondre de manière individuelle en modifiant son transcriptome et ainsi l'adapter à la température (de Nadal et al. 2011; Lopez-Maury et al. 2008). C'est ce qu'on observe lors de la vernalisation et de la répression spécifique du gène FLC. En effet, la mémoire du passage au froid est directement enregistrée au niveau du gène par des modifications épigénétiques (Berry and Dean 2015). A l'échelle de la plante (population de cellules) la réponse est de type ON/OFF, comme un interrupteur. Cependant, toutes les cellules ne sont pas nécessairement synchrones. Ainsi, en début de vernalisation, peu de cellules sont OFF et la plupart sont ON. Plus la période de froid est longue, plus le nombre de cellules passant d'un état ON à OFF va augmenter jusqu'à obtenir le nombre critique de cellules qui agira sur la plante et la fera basculer d'un état ON à un état OFF. Ainsi, le niveau quantitatif de répression transcriptionnelle de FLC lors des températures chaudes est généré par une quantité définie de cellules passant à un état FLC silencieux stable (Figure 5 ; (Berry et al. 2015; Angel et al. 2011)). Bien que l'étude de l'expression de FLC ait mis à jour des mécanismes très complexes et peut-être même spécifique en terme de régulation, elle aboutit à un concept assez simple de régulation. Ainsi, le passage d'un état ON à OFF à l'échelle de la plante ne se révèle pas être entièrement synchrone, ce qui démontre une certaine stochasticité lors de cette transition. De nombreux autres gènes dont l'expression dépend des conditions environnementales peuvent être régulés de cette manière et seules des approches permettant d'analyser l'expression à l'échelle de la cellule pourront permettre de comprendre cette variabilité entre les cellules. Cela commence à être possible grâce à des approches de séquençage de cellules uniques ou par des approches de biologie cellulaire (Efroni et al. 2015; Brennecke et al. 2013).

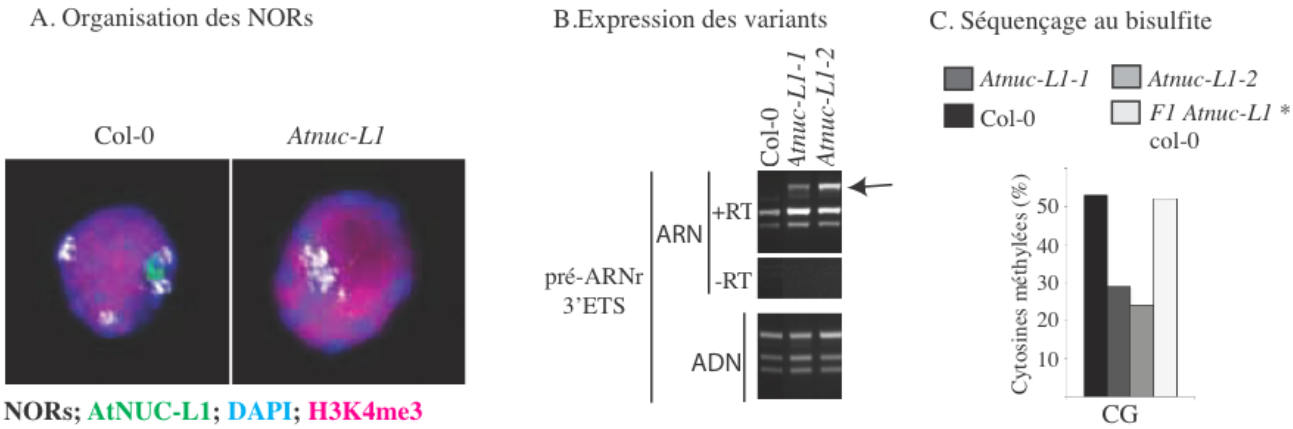


Figure 6 : AtNUC-L1 régule le nombre de gènes activement transcrits d'ARNr 45S
A-C. Images tirées de Pontvianne et al., 2010. **A.** Visualisation de noyaux montrant la localisation d'AtNUC-L1 (vert), H3K4me3 (rose), et de l'ADN (DAPI, en bleu), avec les NORs visualisés par FISH (blanc/gris) dans un noyau de feuilles de plantes sauvages (Col-0) et mutantes (*Atnuc-L1)*. **B**. PCR sur des ADNc (panel du haut) ou de l'ADN (panel du bas) montrant l'expression des 3 variants majeurs codant des gènes d'ARNr 45S chez les plantes sauvages (Col-0) ou mutantes *AtnucL1*. **C.** La méthylation des cytosines dans le contexte CG de la région promotrice des gènes d'ARNr 45S a été déterminé par séquençage au bisulfite. Dans les deux lignées mutantes *Atnuc-L1* se retrouvent deux fois moins de méthylation en CG que chez le sauvage et dans la descendance F1 d'un croisement entre *Atnuc-L1* et col-0.

IV. Activités de recherche de 2003 A 2012:

Pendant mes travaux de thèse et lors de mon premier stage post-doctoral chez Craig Pikaard, ma thématique de recherche a été orientée vers la compréhension des mécanismes impliqués dans l'organisation, la transcription et la maturation des ARNr 45S chez les plantes, ces mécanismes étant très conservés chez les eucaryotes.

A. Travaux de thèse d'Octobre 2003 à Février 2007

« Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'AtNUC-L1 et d'AtNUC-L2, deux protéines de type nucléoline chez *Arabidopsis thaliana* ».
Sous la direction du Dr Saez-Vasquez

Mon travail de thèse était notamment centré sur l'étude du rôle de deux protéines de type nucléoline chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. La nucléoline est une protéine nucléolaire multifonctionnelle intervenant dans la transcription et la maturation des ARNr 45S. Mes travaux ont permis pour la première fois d'isoler un organisme pluricellulaire mutant pour un gène codant une protéine de type nucléoline, *At*NUC-L1. L'analyse de l'absence d'*AtNUC-L1* a permis de révéler le rôle de cette protéine lors du développement de la plante. En effet, les mutants *Atnuc-L1* présentent un retard de croissance significatif dû à un nombre réduit de cellules. Au niveau cellulaire, la structure du nucléole est altérée dans ces mutants, ainsi que dans le niveau de condensation de la chromatine au niveau des NORs (Pontvianne et al. 2007). Toutefois, un second gène codant une protéine de type nucléoline *At*NUC-L2, normalement non exprimé, est réactivé dans les mutants *Atnuc-L1* et permet de compenser partiellement l'absence d'*At*NUC-L1 (Pontvianne et al. 2007). J'ai continué à caractériser la fonction d'*At*NUC-L1 lors de mon stage postdoctoral en montrant l'existence de plusieurs variants de gènes d'ARNr 45S différentiellement transcrits. J'ai montré qu'*At*NUC-L1 est uniquement présent sur les gènes activement transcrits d'ARNr 45S et que son absence provoque une augmentation du nombre de gènes actifs dans le nucléole (figure 6A-B). Enfin, cette réactivation est suivie d'une diminution de 50% de la méthylation des cytosines dans un contexte symétrique CG, démontrant une action directe et indirecte d'*At*NUC-L1 sur le niveau de méthylation des gènes d'ARNr 45S (Figure 6C ; (Pontvianne et al. 2010a)).

Un second projet a consisté en l'identification d'une soixantaine de composants protéiques du complexe RNP contenant le petit ARN nucléolaire (snoARN) U3 chez les Brassicaceae (Samaha et al. 2010). Ce complexe avait été préalablement identifié au sein du laboratoire Génome et Développement des Plantes (LGDP) de Perpignan et joue un rôle déterminant dans la maturation en 5' des pré-ARNr 45S (Saez-Vasquez et al. 2004).

Pendant ma thèse, j'ai également participé à la caractérisation de 2 facteurs de maturation permettant le clivage des pré-ARNr 45S en ARNr 18S, 5,8S et 25S matures. L'un de ces facteurs est *At*RTL2, une protéine de type RNAse III, capable de cliver *in vitro* et *in vivo* en 3' les pré-ARNr 45S (Comella et al. 2008).

Pendant cette période, j'ai encadré ou co-encadré avec Julio Saez-Vasquez deux étudiants de Licence 3 pendant 2 mois (Chémy N'gong, université de Perpignan et Nicolas

Schlinger, université de Bordeaux II), ainsi qu'une étudiante en Master 1 pendant 3 mois (Haijin XU, master 1 Université de Perpignan).

Bilan Bibliographique :

1. **Pontvianne F**, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J **(2007)**. Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in Arabidopsis. ***Mol. Biol. Cell*** 18: 369-379

2. Comella* P, **Pontvianne F*,** Lahmy S*, Vignols F*, Barbezier N, DeBures A, Jobet E, Brugidou C, Echeverria M, and Sáez-Vásquez J (**2008**) Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. ***Nucleic Acids Research*** 36: 1163-1175

3. Samaha H, Delorme V, **Pontvianne F**, Cooke R, Delalande F, Van Dorsselaer A, Echeverria M, Sáez-Vásquez J. (**2010**) Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a B.oleracea RNP complex involved in processing of pre-rRNA. ***Plant J***. Feb:61(3):383-398.

4. **Pontvianne F**, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ, Tourmente S, Pikaard CS, Sáez-Vásquez J. (**2010**) Nucleolin Is Required for DNA Methylation State and the Expression of rRNA Gene Variants in Arabidopsis thaliana. ***PLoS Genet***. Nov 24;6(11):e1001225

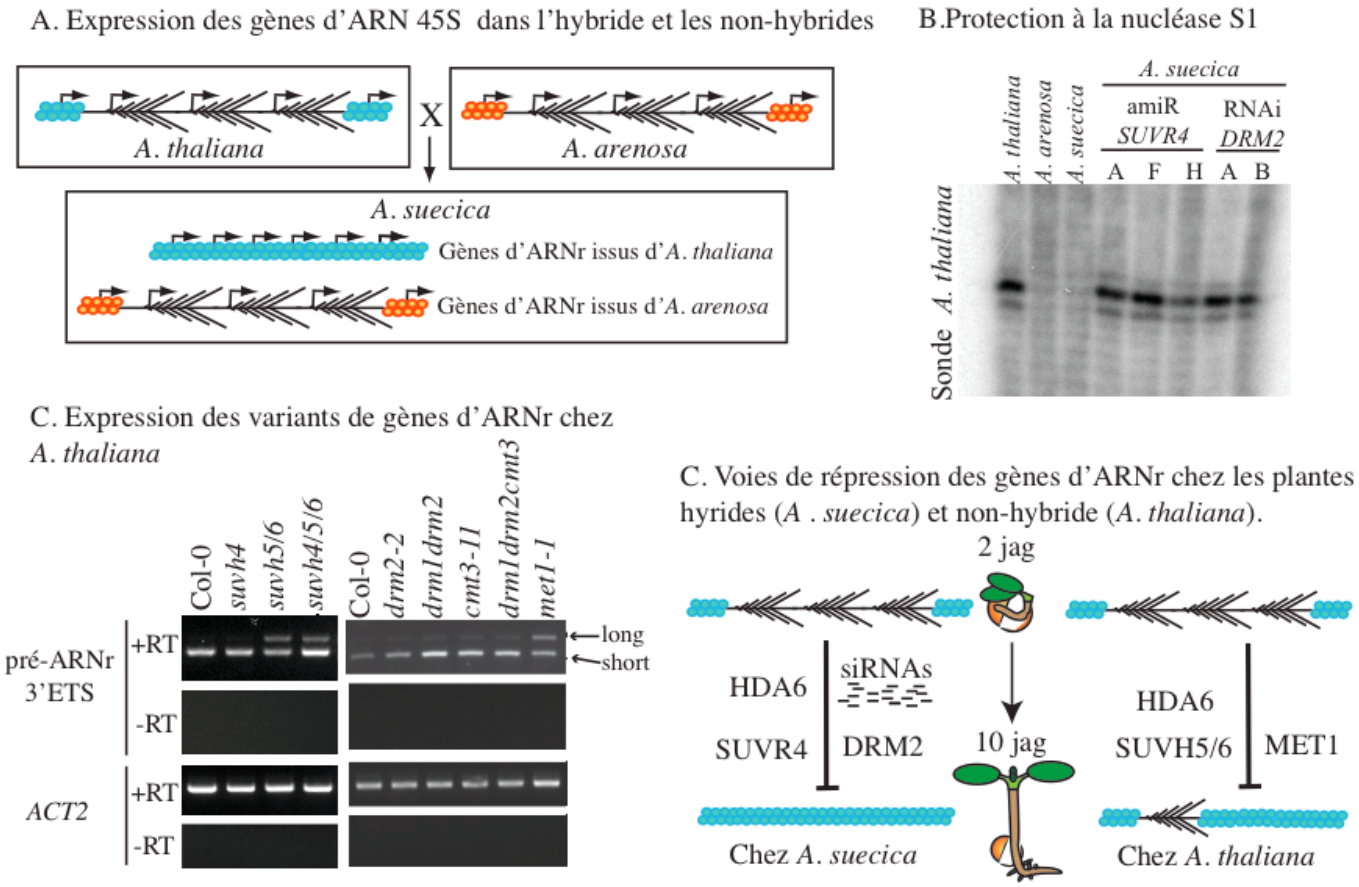


Figure 7 : Différentes HKMTs sont impliquées dans la répression des gènes d'ARNr 45S chez l'hybride *A. suecica* et le non-hybride *A. thaliana*

A-C Images tirées de Pontvianne et al., 2012; 2013**. A**. Diagramme représentant le niveau d'expression des gènes d'ARNr 45S. Au sein de *l'hybride A. suecica,* les gènes d'ARNr 45S dérivant de la contribution ancestrale du génome d'*A. thaliana* sont réprimés, tandis que ceux dérivant d'*A. arenosa* sont exprimés. **B.** Le niveau d'accumulation des pré-ARNr 45S dérivant d'*A. thaliana* a été testé par la technique de protection à la nucléase S1 à l'aide d'une sonde spécifique pour les gènes d'ARNr 45S provenant d'*A. thaliana*. Chez *A. suecica*, aucun signal n'est détecté à cause de la dominance nucléolaire. Les lignées d'*A. suecica* exprimant un microARN artificiel ciblant le gène *SUVR4* expriment les gènes d'ARNr 45S provenant d'*A. thaliana*. Les lignées RNAi *DMR2* servent de contrôle positif ici. **C**. L'expression du variant 1 d'ARNr 45S qui représente près de 50% de l'ensemble des gènes d'ARNr 45S, a été analysée par RT-PCR chez *A. thaliana*. Non transcrit dans le sauvage et la plupart des mutants testés, le variant 1 est exprimé dans le double mutant *suvh5/6*, le triple mutant *suvh4/5/6* et le mutant *met1-1***. D**. Modèle décrivant les voies de répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr d'A. thaliana ou dérivant d'*A. thaliana* chez l'hybride *A. suecica*. Dans les deux cas, cette répression est établie lors des premiers jours de vie des plantules (jag = jour après germination).

B. Travaux du stage Postdoctoral réalisé au laboratoire de Craig S. Pikaard de Septembre 2009 à Juin 2011

De septembre 2007 à juin 2011, j'ai rejoint le laboratoire de Craig Pikaard à Washington University (Saint-Louis, MO), puis à Indiana University (Bloomington, IN) en qualité de chercheur post-doctorant. J'ai réalisé une recherche toujours centrée sur l'étude de la transcription des ARNr 45S chez les plantes, en concentrant mes efforts sur la compréhension des mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes.

J'ai ainsi étudié l'implication du niveau de condensation et des modifications de la chromatine sur la transcription des gènes d'ARNr 45S dans deux contextes différents : chez l'hybride *Arabidopsis suecica* (hybride des espèces *A. thaliana* et d'*A. arenosa*), et chez le « non-hybride » *A. thaliana*. Chez l'hybride *A. suecica*, un phénomène épigénétique connu sous le nom de dominance nucléolaire provoque la répression transcriptionnelle des gènes codant les ARNr 45S dérivant du génome d'*A. thaliana*. En conséquence, le pool d'ARNr matures produits chez *A. suecica* provient en grande majorité de la transcription des gènes d'ARNr 45S du génome d'*A. arenosa* (Figure 7A ; (Preuss and Pikaard 2007)).

Un de mes projets a été de réaliser un crible génétique afin d'identifier les protéines impliquées dans la mise en place de modifications post-traductionnelles d'histones, notamment la méthylation de lysines en position 9 de l'histone H3 (H3K9). Cette modification est associée à un état non-permissif de la chromatine chez les eucaryotes. Près d'une quinzaine de gènes ayant une activité putative de méthyltransférase d'histones (HKMTs) en position H3K9 existent chez Arabidopsis (Pontvianne et al. 2010b). Mes travaux ont permis d'identifier la protéine SUVR4 comme l'HKMT impliquée dans la dominance nucléolaire. Ainsi, la répression du gène *SUVR4* provoquée par un microARN artificiel provoque la réactivation transcriptionnelle des gènes d'ARNr dérivant du génome d'*A. thaliana* chez l'hybride *A. suecica* (Figure 7B). En revanche, l'absence de SUVR4 ne modifie pas le nombre de gènes d'ARNr activement transcrits chez le « non-hybride » *A. thaliana*. En effet, d'autres HKMTs en position H3K9 (SUVH5 and SUVH6) sont responsables de la régulation du nombre de gènes d'ARNr 45S activement transcrits (Figure 7C). En parallèle, j'ai démontré que l'ADN méthylase MET1, impliquée dans la méthylation CG, jouait également un rôle important dans cette répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr chez *A. thaliana*. Or, au sein de l'hybride *A. suecica*, c'est l'ADN méthylase DMR2, responsable de la méthylation dans un contexte CHH et guidée par les petits ARN, qui est impliquée dans la dominance nucléolaire (Preuss et al. 2008). En résumé, mon travail a permis d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle des gènes d'ARNr 45S chez les plantes hybrides et non-hybrides et a permis de mettre à jour des voies de répressions transcriptionnelles faisant intervenir des facteurs différents (Figure 7D) (Pontvianne et al. 2012). De façon importante, une expression allélique différentielle induisant une dominance nucléaire est également observée pour plusieurs centaines de gènes chez l'hybride et joue un rôle dans la vigueur hybride (Chen 2010). Ainsi, il est probable que SUVR4 et cette voie de répression soit également impliquée dans la mise en place de cette expression allélique différentielle.

Lors de cette étude, j'ai également mis en évidence le rôle clef de deux autres HKMTs: ATXR5 et ATXR6, responsables de la majorité de la mono-méthylation des Lysine 27 des histones 3 (H3K27me1) (Jacob et al. 2009). ATXR5 et 6 sont en effet importantes dans l'organisation spatiale nucléaire des NORs et dans les mécanismes de sélection des gènes d'ARNr 45S devant être transcrits. L'analyse de ces mutants a ainsi permis de révéler que le

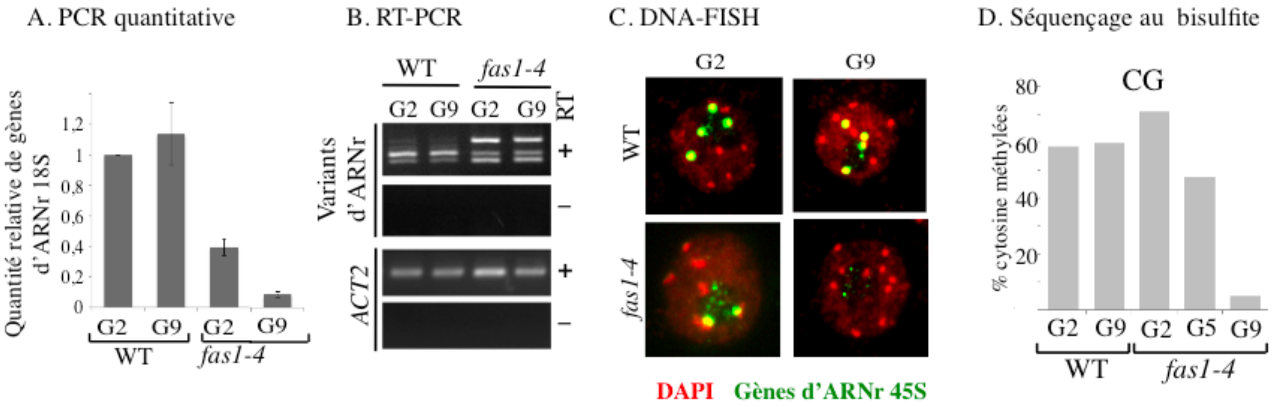


Figure 8 : La localisation subnucléaire et le niveau d'expression des gènes d'ARNr 45S dépend du nombre de gènes total d'ARNr et de leur niveau de méthylation.
A-D Images tirées de Pontvianne et al., 2013. **A**. Détermination de la quantité relative des gènes d'ARNr 45S dans différentes générations du mutant *fas1-4* par rapport aux plantes sauvages par PCR quantitative : perte du nombre de gènes d'ARNr 45S au cours des générations dans le mutant *fas1-4***.** **B**. Détection de l'expression des variants d'ARNr 45S par RT-PCR : le long variant est exprimé dans le mutants *fas1-4*. **C.** Localisation des gènes d'ARNr 45S par DNA-FISH : localisation uniquement dans le nucléole chez les mutants *fas1-4,* surtout à la génération 9 (G9). **D**. Analyse de la méthylation des CG par séquençage au bisulfite : perte de la méthylation au cours des générations dans le mutants *fas1-4*.

que le choix du type d'ARNr devant être transcrit était déterminé par la quantité disponible du variant (Pontvianne et al. 2012). Cette publication est disponible en annexe de ce document.

Ensuite, afin d'établir plus précisément le lien entre (1) état transcriptionnel, (2) localisation sub-cellulaire et (3) méthylation de l'ADN, j'ai développé une technique de purification des nucléoles via cytométrie de flux trieur (FANoS). Cette approche a permis d'établir une cartographie des variants d'ARNr associés au nucléole, ainsi que le méthylome des gènes d'ARNr 45S présents ou non dans le nucléole (Pontvianne et al. 2013). Lors de cette étude, j'ai également analysé comment était modifiée cette organisation dans un mutant présentant moins de gènes d'ARNr 45S dans le génome nucléaire (les mutants *fas1* et *fas2 ; Figure* 8) (Mozgova et al. 2010). Ce travail a permis de démontrer que l'organisation des gènes d'ARNr 45S au sein de la cellule était très dynamique et était corrélé directement aux besoins cellulaires (Pontvianne et al. 2013). Cette publication est disponible en annexe de ce document.

Mon second projet majeur a été de comprendre le rôle de la transcription intergénique (production d'ARN non-codants) dans la régulation de la transcription de gènes adjacents. Les petits ARN interférents de 24 nucléotides (24nt-siARN) sont capables de recruter différents facteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN sur une région chromosomique particulière et de modifier son état pour devenir non permissif. Ce processus est connu sous le nom de voie du *R*NA-*d*irected-*D*NA-*M*ethylation (RdDM) et implique notamment les ARN polymérases IV et V, spécifiques des plantes (Matzke et al. 2009). Dans le cas des gènes d'ARNr 45S, les 24nt-siARN dérivent du clivage de précurseurs plus longs provenant des régions intergéniques. Brièvement, lorsque ces transcrits sont présents, nous observons l'accumulation de 24nt-siARN qui entraîne la méthylation de certaines cytosines au niveau des gènes adjacents. Le Dr Keith Earley et moi-même avons tous deux contribué de manière égale à ce travail publié dans la revue Genes and Development (Earley et al. 2010).

Cependant, une analyse plus précise du profil d'accumulation des petits ARN provenant de la région intergénique des gènes ARNr 45S chez le mutant de l'histone déacétylase 6 (*hda6*) nous ont permis de révéler l'existence de deux populations distinctes de petits ARN. Une population de 21nt-siARN générée à partir de transcrits intergéniques provenant d'une région composée d'éléments répétés et une population 24nt-siARN, générée à partir de la région promotrice non répétée des gènes d'ARNr 45S (figure 9A). Ces deux populations de petits ARN existent dans les plantes sauvages mais à des proportions plus faibles. Aussi, afin de faciliter l'étude de leurs voies de biogenèse, le Dr Todd Blevins et moi-même avons collaboré pour disséquer génétiquement ce processus dans le mutant *hda6*, où ces petits ARN sont accumulés de façon importante. Pour cela, plus de 30 nouvelles combinaisons de mutants doubles, triples et quadruples ont été générées par croisement. Leurs analyses nous ont permis d'identifier deux voies indépendantes responsables de leur biogenèse. La voie classique de méthylation *de novo* (RdDM) génère les petits 24nt-siARN et une autre voie impliquant la RNA-Dependant RNA Polymérase 6 et l'enzyme Dicer-Like 4 génère les 21nt-siARN (Figure 9A ; Pontvianne et *al*., en préparation). Par ailleurs, l'analyse du niveau de méthylation dans ces différents mutants a permis de confirmer que la grande majorité de la méthylation *de novo* observée le long des gènes d'ARNr 45S est dépendante des 24nt-siARN et non des 21nt-siARN. Ainsi, de façon intéressante, des ARN polymérases différentes sont impliquées dans la synthèse des siARN dérivant des gènes d'ARNr 45S et leur recrutement différentiel semble directement lié à la nature répétée ou non des séquences cibles (figure 9A).

Enfin, Todd Blevins et moi-même avons également analysé par séquençage haut débit (RNA-seq ; Solexa) l'ensemble de petits ARN et le transcriptome des mutants *hda6*, et des

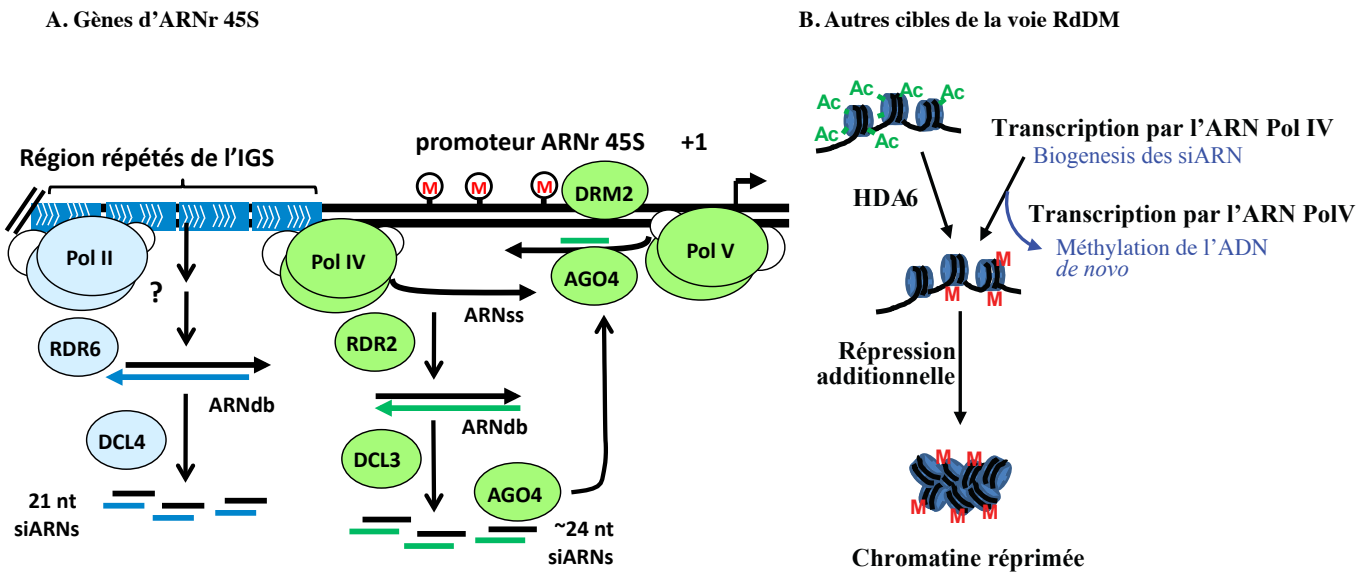


Figure 9 : Deux voies de répressions sont impliquées le long des gènes d'ARNr 45S. Pour d'autres loci, HDA6 est important pour le recrutement de la voie RdDM

A. Diagramme représentant l'ensemble des facteurs impliqués dans les deux voies de biogenèse des 21 et 24nt-siARN le long des gènes d'ARNr 45S. Hormis l'ARN pol II, le rôle de l'ensemble de ces facteurs a été validé par des approches génétiques. **B.** Pour plusieurs centaines de loci, l'activité de HDA6 est importante pour le recrutement de la voie RdDM et donc l'accumulation de petits ARN capable d'induire la méthylation, et donc la répression transcriptionnelle de ces loci.

doubles mutants *hda6 nrpd1* et *hda6 nrpe1*, sachant que *NRPD1* et *NRPE1* codent les grandes sous-unités catalytiques spécifiques de l'ARN pol IV ou V respectivement. Cette approche a permis de révéler que plusieurs *loci*, réprimés par la voie RdDM et impliquant les ARN pol IV et V, ne pouvaient garder cet état silencieux à la génération suivante en l'absence d'HDA6 (Figure 9B). Le rôle d'HDA6 pour ces gènes est donc situé en amont de la voie du RdDM (Blevins et al. 2014).

Durant cette période, j'ai co-encadré un étudiant en master 1 (Brandon Lee) et deux étudiants en master 2 (Chinmayi Chandrasekhara et Junzhou Wang). Ces encadrements permettront à Brandon et Junzhou d'être co-auteur d'un article actuellement en préparation. J'ai également co-encadré avec Craig Pikaard l'étudiante Chinmayi Chandrasekhara lors de sa premiere année de thèse. Cet encadrement a notamment permis à Chinnmayi d'être co-auteur de 3 de mes articles listés ci-dessous. Ella depuis publiée son travail de thèse en tant que premier auteur dans *Genes and Development*.

Bilan Bibliographique :

1. **Pontvianne F***, Blevins T*, Wang J, Brandon L, Chandrasekhara C and Pikaard CS. Two distinct RdDM-like pathways are required for proper rRNA gene dosage in *A. thaliana.* (en preparation)

2. Chandrasekhara C, Mohannath G, Blevins T, **Pontvianne F** and Pikaard CS. (**2015**) Chromosome-specific NOR inactivation accounts for selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. ***Genes & Development*** 30: 177–190.
   Highlighted by: Pamela J. Hines (Senior Editor of Science):For rRNAs it's location location location (**2016**). **Science** p.352

3. Ream TS, Haag JR, **Pontvianne F**, Nicora CD, Norbeck AD, Paša-Tolić L, Pikaard CS. (**2015**) Subunit compositions of Arabidopsis RNA polymerases I and III reveal Pol I- and Pol III-specific forms of the AC40 subunit and alternative forms of the C53 subunit. ***Nucleic Acids Research*** Apr 30;43(8):4163-78.

4. Blevins T, **Pontvianne F**, Cocklin R, Podicheti R, Chandrasekhara C, Yerneni S, Braun C, Lee B, Rusch D, Mockaitis K, Tang H, Pikaard CS. (**2014**) A two-step process for epigenetic inheritance in Arabidopsis. ***Molecular Cell***. Apr 10;54(1):30-42.

5. **Pontvianne F#**, Blevins T, Chandrasekhara C Mozgová I, Hassel C, Pontes OM, Tucker S, Mokros P, Muchová V, Fajkus J, Pikaard CS#. (**2013**) Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. ***Genes & Development*** 27:1545-1550.

6. **Pontvianne F**, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD, Pikaard CS. (**2012**) Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. ***Genes & Development*** 26:945-957.

7. **Pontvianne F**, Blevins T, Pikaard CS. (**2010**) Arabidopsis Histone Lysine Methyltransferases. ***Adv. In Bot. Res***. Jan. (53) 1-22

8. Earley KW*, **Pontvianne F*,** Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. (**2010**) Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. ***Genes & Development*** 24: 1119-1132

9. Tessadori F, van Zanten M, Pavlova P, Clifton R, **Pontvianne F**, Snoek LB, Millenaar FF, Schulkes RK, van Driel R, Voesenek LA, Spillane C, Pikaard CS, Fransz P, Peeters AJ. (2009) Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics** Sep;5(9):e1000638.

C. Travaux du stage Postdoctoral réalisé au laboratoire d'Edouard Bertrand d'octobre 2011 à septembre 2012

Ce choix professionnel a été guidé par mon envie d'approfondir mes connaissances sur les techniques de pointe en imagerie cellulaire, afin de pouvoir les importer au système « plante » lorsque cela est pertinent et possible. En effet, l'équipe du Dr Edouard Bertrand excelle dans ce domaine et possède notamment toute l'expertise nécessaire à la visualisation d'une molécule unique d'ARN au sein d'une cellule (en cellules fixées ou en imagerie en temps réel).

J'ai réalisé lors de ce stage une recherche toujours axée sur les mécanismes fondamentaux de la croissance cellulaire, mais en utilisant des lignées cellulaires humaines comme système d'étude. Mon projet a eu pour but de mieux comprendre le rôle du complexe CBCAP, qui se compose des protéines ARS2, de PHAX et du complexe nucléaire de liaison de la coiffe (CBC). Le CBCAP est un régulateur essentiel de la croissance cellulaire qui agit sur le niveau d'accumulation de plus d'un millier d'ARN codants et non-codants impliqués dans la croissance cellulaire (ARNm d'histones, ARNm de protéines ribosomiques, snARN, sno/scaARN), mais dont le rôle précis reste indéterminé. J'ai étudié à quelles étapes de la vie des ARN le complexe CBCAP est impliqué, par des approches de biologie cellulaire, moléculaire et biochimique. Ainsi, j'ai analysé le rôle du CBCAP lors de la formation des ARN en 3' (Hallais et al. 2013).

Bilan Bibliographique :

1. Hallais M, **Pontvianne F**, Andersen PR, Clerici M, Lener D, Benbahouche Nel H, Gostan T, Vandermoere F, Robert MC, Cusack S, Verheggen C, Jensen TH, Bertrand E. (**2013**) CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. ***Nature Struct Mol Biol.*** Dec;20(12):1358-66.

V. Les fonctions nucléolaires dans des conditions environnementales changeantes

A mon entrée au CNRS en octobre 2012, j'ai rejoint l'équipe de Julio Saez-Vasquez dont le projet majeur est de comprendre la fonction du nucléole chez les plantes et plus particulièrement la biogenèse des ribosomes dans des conditions environnementales changeantes. J'ai ainsi participé au développement des projets déjà en cours au sein de l'équipe et ma contribution est décrite dans cette section. En utilisant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, mon travail a permis de caractériser la composition du nucléole en ADN génomique, en ARN, mais aussi en protéines. Ces résultats soulèvent l'existence potentielle de nouvelles voies de régulations dans lesquelles le nucléole jouerait un rôle prépondérant. Ces voies de régulations ont pour point commun d'utiliser les caractéristiques très spécifiques du nucléole comme le fait que l'ARN pol II y soit exclue. L'utilisation du nucléole comme zone de rétention sera largement discutée dans ce manuscrit à la lumière des résultats obtenus.

A. Du Fe dans le nucléole des cellules végétales

L'équipe de Cathy Curie et Stéphane Mari (BPMP, Montpellier) a récemment développé une procédure histochimique appelée Perls / DAB qui permet de colorer le Fe directement dans les cellules végétales (Roschzttardtz et al. 2009). De manière intéressante, en plus des sites de localisation connus où s'accumulent le Fe tels que les plastes, cette approche a permis de détecter des concentrations très élevées de Fe dans le nucléole de nombreux types de cellules (Roschzttardtz et al. 2011). On a pu mettre en évidence que l'accumulation de Fe dans le noyau de cellules humaines est plutôt liée à un dysfonctionnement cellulaire comme dans certaines maladies neurodégénératives type Alzheimer. Le Fe induit dans ce cas une hyperméthylation des gènes d'ARNr, inhibe leur transcription et provoque l'oxydation des ARNr (Schroder 2005; Quintana et al. 2006). Le fait que le Fe s'accumule dans le nucléole de cellules végétales saines suggère qu'il pourrait avoir un autre rôle structurel ou catalytique. Cela soulève aussi de nombreuses questions comme : quelle est la proportion de Fe libre ? Comment est-il transporté dans le nucléole ? Quels sont ses partenaires ?

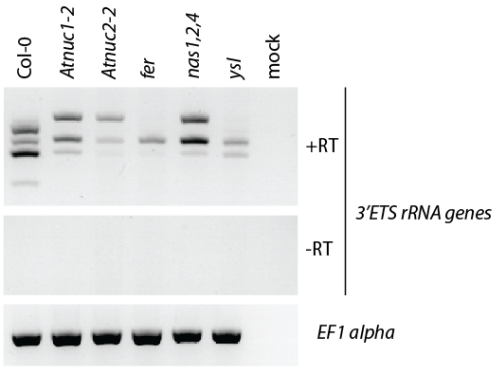
L'ANR SubCellif, portée par Stéphane Mari et dont l'équipe de Julio Saez-Vasquez est un des 3 partenaires, a notamment pour but de répondre à quelques-unes de ces questions. Ainsi, dès mon arrivée, j'ai activement participé aux recherches pour permettre de comprendre le lien entre le Fe et l'activité majeure du nucléole : la biogenèse des ribosomes. J'ai encadré ou co-encadré avec Julio Saez-Vasquez deux stagiaires de master 1 sur ce projet.

1. Impact du pool de Fe sur la biogenèse des ribosomes

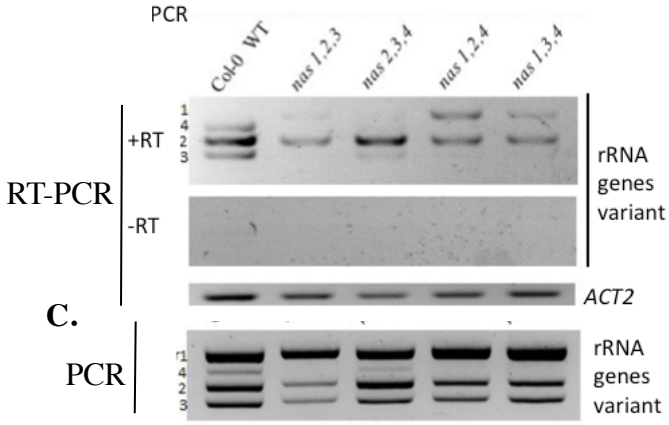
Cette partie a eu pour but d'étudier l'effet sur le métabolisme des ARNr lorsque l'homéostasie et le transport du Fe étaient également affectés (Grillet et al. 2014). Dans ce but, plusieurs mutants ont été analysés (Figure 10):

-des mutants affectés dans le transport intercellulaire du Fe (Nicotianamine Synthase ou NAS, nécessaire à la production de la Nicotianamine (NA) laquelle participe à la distribution du Fe dans l'organisme) (Schuler and Bauer 2011) ;

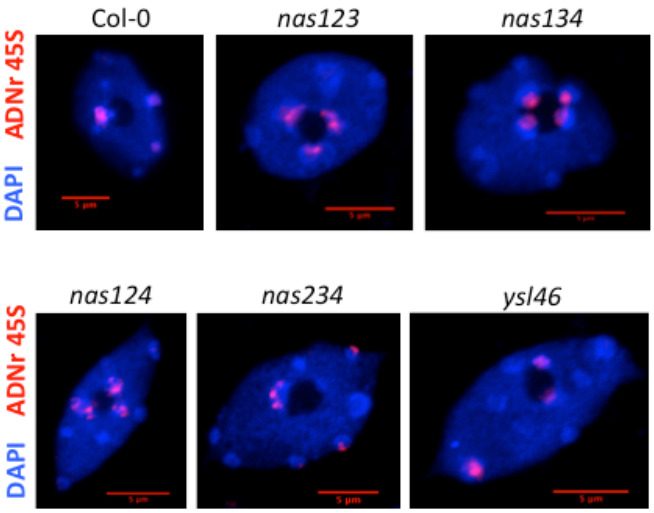
A. Détection des variants d'ARNr 45S par RT-PCR



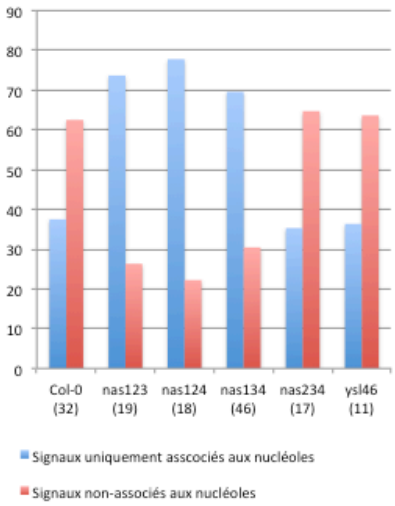
B. Détection des variants d'ARNr 45S



D. Détection des gènes d'ARNr 45S par FISH



E. Distribution des gènes d'ARNr 45S



F-J. Coloration au Perl/DAB du Fe à partir de feuilles

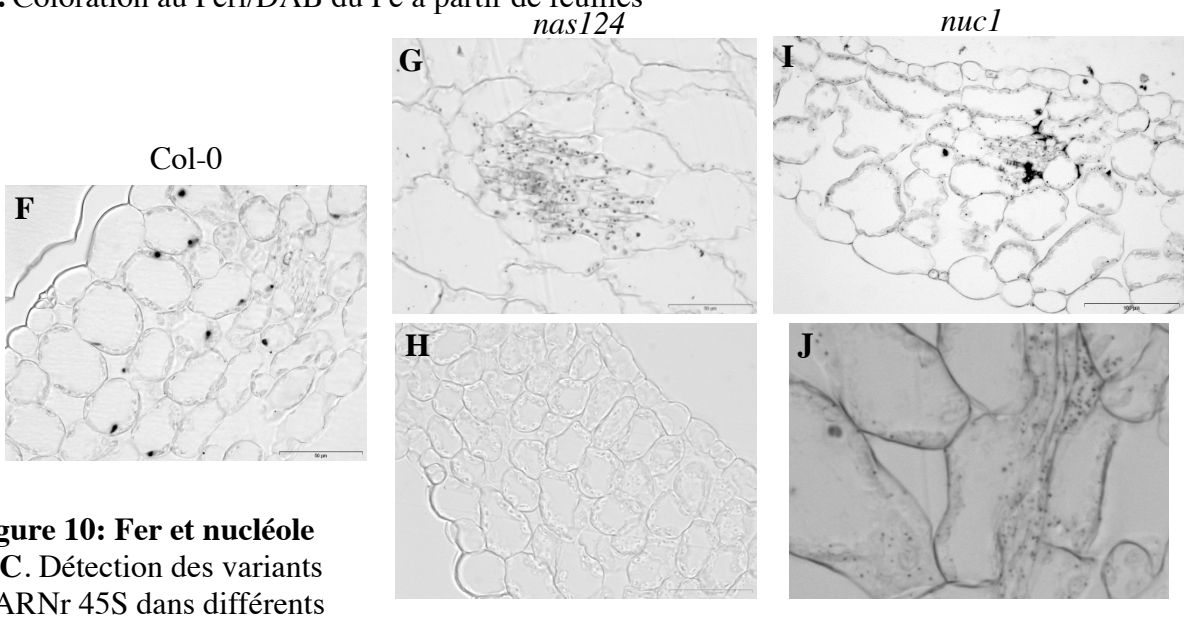


Figure 10: Fer et nucléole
A-C. Détection des variants d'ARNr 45S dans différents mutants affectés dans l'homéostasie du fer à partir d'ADNc (A,B) ou d'ADNg (C). **D**. Détection des gènes d'ARNr par FISH à l'aide d'une sonde s'hybridant au niveau du TIS dans les mutants affectés dans l'homéostasie du fer. **E.** Histogramme représentant le nombre de NOR associés au nucléole dans les différents génotypes. **F-J**. Coloration du Fer au Perl/DAB à partir de feuilles de plantules de 15 jours Col-0 (F), *nas124* (G-H) et *nuc1* (I-J).

-des mutants affectés dans certains transporteurs membranaires (Yellow Stripe-Like / YSL) (Curie et al. 2009) ;

-des mutants affectés dans le stockage du Fe (Ferritines / FER) (Briat et al. 2010).

De manière intéressante, nous avons pu démontrer que dans des mutants *nas*, la composition du pool de gènes d'ARNr exprimés était différente de celle du sauvage ou d'autres mutants analysés (Figure 10A-B). Des différents variants d'ARNr 45S présents chez *A. thaliana* Col-0, le variant de type 1 représente la moitié du pool total. Ils composent l'ensemble des gènes d'ARNr présents dans le NOR2 et sont inactifs dans les cellules de feuilles (Pontvianne et al. 2010b; Chandrasekhara et al. 2016). Cependant, ces variants d'ARNr de type 1 sont exprimés dans le triple mutant *nas124*. Quatre gènes codent pour des NAS chez *A. thaliana*. Puisque le développement et la croissance du quadruple mutant *nas1234* est fortement altérée, nous avons analysé de façon systématique les différentes combinaisons de triples mutants des quatre gènes (Schuler and Bauer 2011). Seul le triple mutant *nas234* ne présente pas ce phénotype moléculaire, ce qui suggère une implication plus spécifique du gène *NAS1*. Une analyse génomique des variants d'ARNr a également été réalisée par PCR sur ces triples mutants afin de s'assurer que la variabilité de leur expression n'était pas liée à un changement de leurs proportions respectives dans le génome (Figure 10C).

Chez le sauvage, le NOR2 étant inactif, il n'est pas associé au nucléole. Ainsi, l'expression du variant 1 dans les triples mutants *nas* suggère une réorganisation des NORs au sein du noyau. Des analyses par Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) ont également permis d'observer que la répartition subcellulaire des gènes d'ARNr était perturbée (Figure 10D-E). Le nombre de NORs associés au nucléole est plus important dans les triples mutants exprimant le variant 1.

Les gènes *NAS* sont impliqués dans la production de NA qui permet la redistribution du Fe dans l'organisme. De manière intéressante, des analyses de la distribution du Fe dans le triple mutant *nas124* par la technique de PERL/DAB révèlent une diminution importante du Fe dans les nucléoles (Figure 10F-H ; données réalisées par Lili Wei, BPMP, Montpellier). Parallèlement, des agrégats de Fe sont visibles au niveau du système vasculaire, ce qui suggère une mauvaise redistribution du Fe dans les cellules. Ces données montrent qu'une altération de la distribution du Fe dans le nucléole pourrait affecter la régulation de l'expression des gènes d'ARNr.

2. Impact de la biogenèse des ribosomes et/ou de la structure du nucléole sur le pool de Fe nucléolaire.

Le nucléole étant le siège de la biogenèse des ribosomes, nous avons analysé les conséquences d'une altération de l'organisation du nucléole ou de la biogenèse des ribosomes sur le pool de Fe nucléolaire.

Durant ma thèse, j'ai caractérisé le mutant *nuc1*, muté dans le gène de la nucleoline 1 impliquée dans la régulation transcriptionnelle et la maturation des gènes d'ARNr. Dans ce mutant, la structure du nucléole est affectée et tous les variants d'ARNr sont associés et exprimés au sein du nucléole (Pontvianne et al. 2010a, 2007). Afin de suivre l'effet de cette mutation sur le pool de Fe nucléolaire, des colorations du Fe au PERL/DAB ont été réalisées et comparées dans des cellules issues de feuilles de plantes sauvages ou de plantes mutantes *nuc1* (Figure 10I-J; données réalisées par Lili Wei, BPMP, Montpellier). Le pool de Fe

nucléolaire est fortement affecté dans le mutant *nuc1* et difficilement détectable. En revanche, des signaux plus forts sont visibles au niveau des chloroplastes et sont probablement dus à une accumulation de Fe associé à la Ferritine (Figure 10J). Ces données démontrent une redistribution du pool de Fe cellulaire dans le mutant *nuc1*, avec vraisemblablement une diminution du pool de Fe dans le nucléole, redistribué au niveau des chloroplastes.

L'accumulation de la Ferritine permet à la plante de s'adapter dans un milieu où le Fe est en excès. La Ferritine est alors capable de stocker le Fe qui s'accumule dans la plante, dans les chloroplastes, afin de « neutraliser » le Fe en excès. Dans ce cas, une augmentation importante de l'expression des gènes codant les ferritines, ainsi que le taux de protéines Ferritine sont observés. Dans le mutant *nuc1*, des agrégats semblables à ceux observés en cas d'excès de Fe ont été détectés malgré l'absence d'excès de Fe dans les milieux de croissance. Le post-doctorant Adrien Barbarossa a analysé l'accumulation de la Ferritine dans le mutant *nuc1* et a pu observer que les taux de Ferritines sont plus importants dans le mutant *nuc1* que dans le sauvage. De ce fait, lorsque l'on fait pousser le mutant *nuc1* sur un milieu en excès de Fe, les plantes *nuc1* sont beaucoup plus sensibles que les plantes sauvages.

L'ensemble de ces données suggère que la déstructuration du nucléole modifie le pool de Fe nucléolaire et conduit à la formation d'agrégats de Ferritine au niveau des chloroplastes, comme lors d'excès Fe. Cela entraine une forte altération de la capacité d'adaptation des mutants *nuc1* à un milieu riche en Fe.

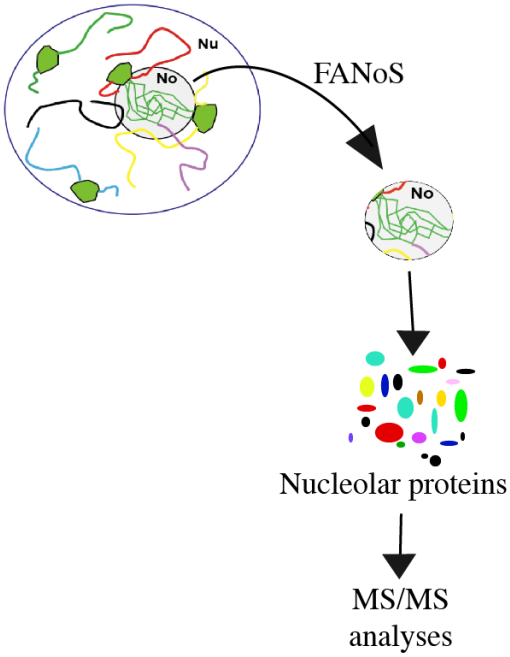
3. Travaux en cours et perspectives

Les données mettent en évidence l'existence d'un lien entre la biogenèse des ribosomes, la structure du nucléole et la présence de ce pool de Fe dans le nucléole. Nous sommes toutefois très loin de savoir s'il s'agit d'un lien direct ou non et nous sommes encore plus loin de comprendre le rôle de ce pool de Fe nucléolaire. Aussi, plusieurs approches sont actuellement poursuivies pour tenter d'apporter quelques éléments de réponse. Deux de ces approches sont présentées ici :

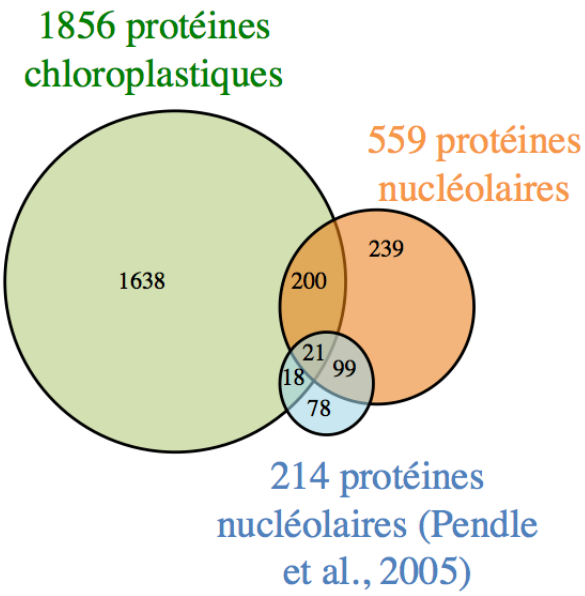
- Le lien entre la présence/absence du Fe et la structure du nucléole va être analysé. La structure du nucléole est rendue visible via la protéine nucléolaire Fibrillarine 2 fusionnée à la GFP qui marque le composé fibrillaire dense (DFC) du nucléole et permet ainsi de suivre la structure et l'organisation du nucléole par imagerie confocale (voir paragraphe III.D et Figure 15A). Ce marqueur a été introgressé dans le mutant *nas124* et va ainsi permettre de déterminer si la structure globale du nucléole est affectée dans ce génotype. Cette structure sera également analysée en cas de carence ou en cas d'excès de Fe chez des plantes sauvages et mutantes *nas124*.

- La fonction du pool de Fe nucléolaire sera étudiée. Ce pool de Fe interagit avec des protéines ou des facteurs spécifiques au sein du nucléole, et nous allons tenter de déterminer les conséquences de la supression de ces interactions. Pour cela, une Ferritine chimérique a été créée afin qu'elle acquière une localisation nucléolaire, en la fusionnant au marqueur Fibrillarine 2 et à la YFP (NoFER). La forte affinité de la Ferritine pour le Fe devrait annihiler les interactions du Fe avec les autres partenaires nucléolaires. Les conséquences de cette neutralisation seront ensuite analysées. L'expression de la protéine chimérique NoFER sera contrôlée par le système d'induction utilisant la dexaméthasone (Schena et al. 1991;

A. Stratégie d'identification des protéines nucléolaires



B. Comparaison des bases de données nucléolaires et chloroplastiques



C. Voie de régulation cellulaire enrichies dans le protéome nucléolaire

Voie de régulation	*p*-value	Nombre de protéines
Ribosome biogenesis in eukaryotes [03008]	4.103622e-28	40
Spliceosome [03040]	2.700452e-16	40
Ribosome [03010]	6.103966e-11	47
Proteasome [03050]	9.153252e-7	15

Figure 11: Description du protéome nucléolaire
A. Schéma décrivant le protocole ayant permis d'obtenir le protéome nucléolaire. **B**. Diagramme de Venn comparant les relations entre les données du duplicat du protéome nucléolaire avec les données du protéome nucléolaire décrit dans (Pendle et al., 2005) et avec les données du protéome chloroplastique décrit dans (Ferro et al., 2010). **C**. Liste des 4 voies de régulation cellulaire enrichies significativement dans le protéome nucléolaire. La p-value a été obtenue par le test de correction Holm-Bonferroni.

Aoyama and Chua 1997). La cassette permettant l'expression de NoFER a été synthétisée et les plantes transformées sont en cours de sélection.

B. Mise à jour du protéome nucléolaire

Depuis plusieurs décennies, les nucléoles sont isolés du reste du noyau à l'aide de plusieurs étapes successives de centrifugations sur gradient de sucrose (Hacot et al. 2010). Une première image du protéome nucléolaire de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* a ainsi été obtenue, identifiant pas moins de 200 protéines (Pendle et al. 2005). Cependant, nous savons aujourd'hui que le nucléole contient beaucoup plus de protéines. Notre équipe a réalisé une mise à jour du protéome nucléolaire, mais cette fois-ci en utilisant la technique de FANoS. Cette fois, le protéome a été obtenu directement à partir d'un organisme entier, plus précisément à partir de feuilles de 3 semaines. Ce travail a été réalisé dans le cadre du master 2 de Charlotte Montacié (encadrée par Julio Saez-Vasquez et Nathalie Durut).

Au cours de deux expériences indépendantes, nous avons identifié 559 protéines communes aux deux expériences, soit près de 80% de la totalité (Figure 11A). Parmi les 200 protéines les plus enrichies, 80% d'entre elles correspondent à des protéines déjà connues comme ayant une fonction nucléolaire, dont 120 des 214 protéines précedemment identifiées (56%) dans le protéome nucléolaire de protoplastes (Figure 11B) (Pendle et al. 2005).

Il avait été observé lors de la purification des nucléoles réalisée par (Pendle et al. 2005), une quantité non négligeable des protéines correspondant à des protéines chloroplastiques. Dans notre cas, la contamination est probablement due à la présence de chloroplastes co-isolés avec les nucléoles lors de la procédure. En éliminant les protéines décrites comme chloroplastiques (Ferro et al. 2010), le nombre de 559 protéines est réduit à 359 (Figure 11B). Il est à noter qu'en appliquant un filtre identique aux données de protéomique du nucléole publiées en 2005, on limite à 183 le nombre initial de 221 protéines nucléolaires (Pendle et al. 2005). Parmi ces 359 protéines, 4 catégories de protéines sont significativement surreprésentées (Figure 11C) : celles impliquées dans la biogenèse des ribosomes, les protéines ribosomiques, des protéines impliquées dans l'épissage et le protéasome. Du fait de la fonction du nucléole, les protéines liées à la fonction de biogenèse des ribosomes étaient attendues. Par ailleurs, lors de la première analyse du protéome nucléolaire, un enrichissement des protéines liées à l'épissage et au métabolisme des ARNm avait également été mis en évidence (Kim et al. 2009; Pendle et al. 2005). Cependant, ces nouvelles données font émerger un lien entre le nucléole et le protéasome. En accord avec Julio Saez-Vasquez, responsable de l'équipe, la liste des protéines nucléolaires identifiées ne seront pas présentées dans ce rapport pour des raisons de confidentialité.

C. Lien entre le nucléole et le protéasome

Le protéasome est un complexe protéase ATP-dépendant responsable de la dégradation de nombreuses protéines chez les plantes et les animaux, pariculièrenent lorsque ceux-ci sont ubiquitinilées (Smalle and Vierstra 2004). Le protéasome est composé de plusieurs protéines possédant une activité ATP-dépendante (les RPT) ou non (les RPN). Si le rôle du protéasome ou des protéines du protéasome au sein du nucléole n'est pas connu, quelques travaux soulèvent tout de même un lien entre ce complexe protéique et le nucléole. Chez la levure, une inhibition de l'activité du protéasome affecte la maturation des pré-ARNr et l'accumulation des pré-ribosomes 90S (Stavreva et al. 2006). En outre, l'équipe de Julio

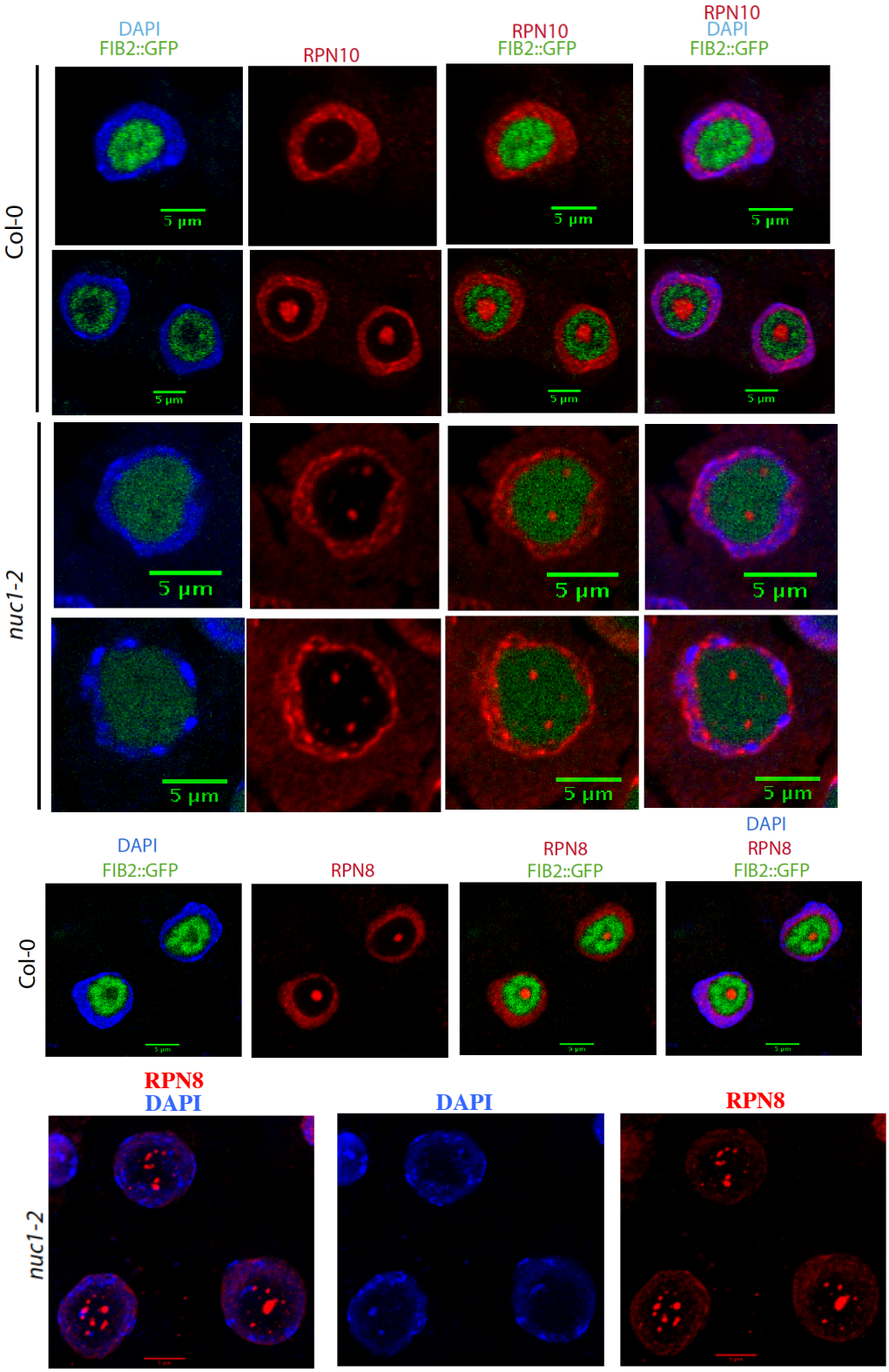


Figure 12: Immunolocalisation des sous-unités RPN 8 et 10 du protéasome
Dans des cellules de racines de plantules de 15 jours, un anticorps anti-RPN10 ou anti-RPN8 a été utilisé pour analyser la localisation subcellulaire de ces deux protéines (en rouge) à partir de plantes sauvage Col-0 ou mutante *nuc1*. la chromatine est colorée au DAPI (en bleu) et la position du nucléole est rendue visible par la protéine de fusion FIB2:YFP (en vert).

Saez-Vasquez a identifié RPN1a, une des sous-unités régulatrices, ainsi que d'autres protéines du protéasome, co-purifié au sein du complexe snoRNP U3 (Samaha et al. 2010). Ce dernier complexe est impliqué dans la maturation co-transcriptionnelle des pré-ARNr. Il est capable de se lier à l'ADNr, au pré-ARNr et de le cliver en 5' (Saez-Vasquez et al. 2004).

Afin de démontrer réellement un lien fonctionnel entre la biogenèse des ribosomes et le protéasome, plusieurs analyses ont été réalisées. Nathalie Durut, encadrée au cours de sa thèse par Julio Saez-Vasquez, a réalisé une partie des expériences présentées ici (Figure 14A).

Localisation subcellulaire des RPN

Une fusion de RPN1a à la GFP avait déjà permis de révéler la localisation nucléaire de cette sous-unité du protéasome (Samaha et al. 2010). Pour compléter nos connaissances sur d'autres parties de la sous-unité régulatrice du protéasome, des approches d'immuno-localisation ont été utilisées sur des noyaux isolés pour visualiser les protéines RPN8 et RPN10. RPN8 et 10 sont toutes deux nucléoplasmiques et présentent un signal au centre du nucléole dans une cellule racinaire sur deux (Figure 12). Cette expérience a été réalisée dans des plantes exprimant le marqueur nucléolaire FIB2:YFP afin de confirmer la localisation intranucléolaire de RPN8 et 10. Cette localisation correspond à la cavité (ou vacuole) nucléolaire décrite dans le paragraphe II.A.2.

Pour le mutant *nuc1*, dans lequel la structure du nucléole est affectée, les nucléoles ne possèdent pas cette cavité. On observe alors que RPN8 et RPN10 sont toujours présentes dans le nucléole, mais cette fois au sein de foci irréguliers et dont le nombre varie (Figure 12).

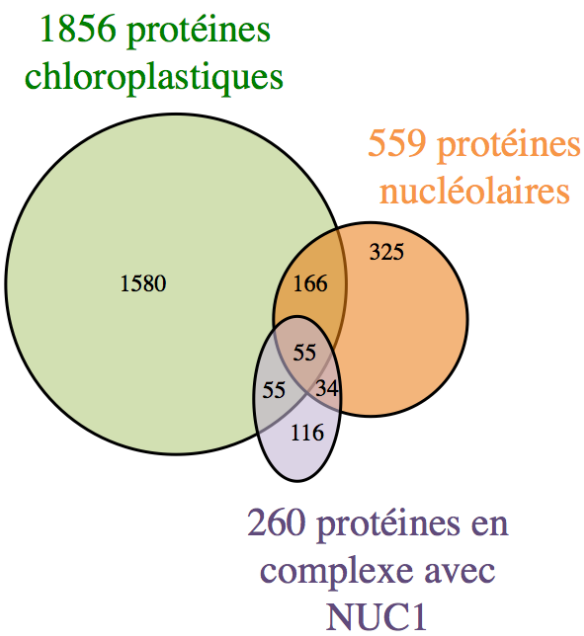
Interaction de NUC1 avec le protéasome

Afin de confirmer un lien physique entre le protéasome et la biogenèse des ribosomes, une expérience de co-immuno-précipitation (co-IP) de NUC1, protéine nucléolaire majeure, a été réalisée à partir de 75 gr de plantes mutantes *nuc1* complémentées par la protéine NUC1 étiquetée avec un FLAG et exprimée sous le contrôle de son propre promoteur. Les interactants ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse (MS/MS). Cette approche a été réalisée avec deux conditions de lavages : une faible {150mM NaCl} et une forte {300mM NaCl}. Parmi les protéines identifiées 260 d'entre elles sont représentées par au moins deux peptides dans les deux expériences. 40% d'entre elles, présentes également dans le chloroplaste, ont été écartées pour le reste de l'analyse (Figure 13A). Sur les 150 protéines restantes, 46 sont directement liées à la biogenèse des ribosomes et 26 appartiennent au protéasome (Figure 13B). Il est intéressant de noter que 34 des protéines présentes dans le « pool » de protéines nucléolaires identifiées précédemment font partie de ces interactants (Figure 13A). De plus, ces 34 protéines communes sont constituées pour la plupart de facteurs impliqués soit dans la biogenèse des ribosomes et soit dans le protéasome (Figure 13C). Cette approche démontre clairement un lien direct entre le protéasome et la biogenèse des ribosomes. Cependant, seule l'interaction entre RPN8 et NUC1 a pu être validée par co-IP et western blot (Figure 13D).

Analyse des mutants rpn1a *et* rpt2

Pour établir l'existence d'un lien fonctionnel entre le protéasome et la biogenèse des ribosomes, les mutants *nrp1a* et *rpt2* ont été analysés. Plusieurs tests permettent de déterminer si la biogenèse des ribosomes est affectée au sein d'un mutant : la classe des gènes d'ARNr transcrits, la distribution des gènes d'ARNr au sein du noyau, la structure du nucléole ou le taux de transcription et de maturation en 5'ETS. Nous avons réalisé toutes ces analyses chez le mutant *rpn1a* et seulement certaines d'entre elles chez le mutant *rpt2* (Figure 14). Ainsi, des transcrits de pré-ARNr issus des variants 1, non transcrits dans les cellules de feuilles des plantes sauvages Col-0, s'accumulent dans le mutant *rpn1a* (Figure 14A, données obtenues

A. Comparaison des données des protéines nucléolaires et chloroplastiques avec les interactants de NUC1



B. Voies de régulation cellulaire enrichies parmi les 160 protéines non chloroplastiques interagissant avec NUC1

Voie de régulation	*p*-value	Nombre de protéines
Proteasome [03050]	1.254277e-26	26
Ribosome [03010]	3.785524e-22	46
Phagosome [04145]	0.015963	9

C. Voies de régulation cellulaire enrichies parmi les 34 protéines nucléolaires, non chloroplastiques, interagissant avec NUC1

Voie de régulation	*p*-value	Nombre de protéines
Ribosome [03010]	6.540432e-10	16
Proteasome [03050]	0.001867	5

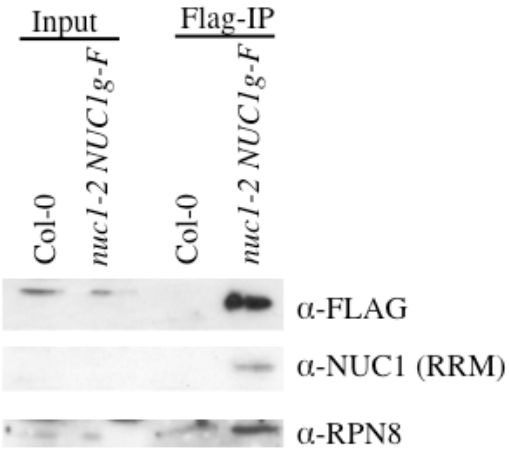


Figure 13: Interaction de NUC1 avec des sous-unités du protéasome
A. Diagramme de Venn comparant les relations entre les données du duplicat du protéome nucléolaire avec les données du protéome nucléolaire et du protéome chloroplastique décrit dans (Ferro et al., 2010) avec les protéines interagissant avec NUC1 . **B-C**. Liste des voies de régulation cellulaire enrichies significativement parmi les protéines interagissant avec NUC1 (B) ou parmi les 34 protéines nucléolaires, non chloroplastiques, interagissant avec NUC1 (C). La p-value a été obtenue par le test de correction Holm-Bonferroni**. D**. Co-immunoprécipitation de NUC1 taguée par un FLAG avec la protéine du protéasome RPN8.

par Nathalie Durut). Cette expression s'accompagne d'une association plus fréquente du NOR2 avec le nucléole, où ces variants 1 sont situés (Figure 14B-C ; (Chandrasekhara et al. 2016)). En revanche, la distribution de la FIB2:YFP au sein du nucléole et qui reflète sa structure, n'est pas modifié chez les mutants *rpn1a* et *rpt2*. Ces analyses suggèrent cependant un rôle potentiel de RPN1A et du protéasome dans l'organisation et la régulation transcriptionnelle des gènes d'ARNr.

Pour résumer, les membres du protéasome sont bien présents dans le nucléole et interagissent directement ou indirectement avec des protéines nucléolaires impliquées dans la transcription et la maturation des gènes d'ARNr. De plus, certaines de ces étapes sont affectées dans le mutant *rpn1a*, même si un traitement des plantes sauvages par un inhibiteur du protéasome n'a pas d'influence dans la transcription et la maturation des gènes d'ARNr. On peut donc avancer qu'un lien physique et fonctionnel existe entre le protéasome et la biogenèse des ribosomes.

D. Nucléole et stress thermique

Chez les mammifères, le nucléole joue un rôle important dans la réponse aux stress cellulaires pouvant être induits soit par une irradiation aux UV-B, soit une hypoxie ou enfin un stress thermique (Jacob et al. 2013; Audas et al. 2012). En cas de stress, des ARN non-codants provenant de la région IGS des gènes d'ARNr (ncARNr) s'accumulent au sein du nucléole (Audas et al. 2012). Ces ncARNr, qui contiennent un motif spécifique, sont alors capables d'interagir avec des protéines comme par exemple SUG1, une protéine régulatrice du protéasome ou l'ADN méthyltransférase DNMT1 (Audas et al. 2012). Du fait de la localisation nucléolaire de ces ncARNr, ces protéines cibles sont alors séquestrées au sein du nucléole et ne peuvent plus assurer leur rôle nucléoplasmique.

Des travaux sont actuellement menés au sein de l'équipe de Julio Saez-Vasquez pour démontrer si ce type de régulation peut exister chez les plantes. Nathalie Durut, doctorante, et Claire Picart, assistant ingénieure, ont contribué à la genèse des résultats présentés dans cette section.

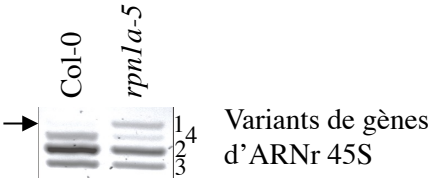
La structure du nucléole est affectée en cas de stress

La Fibrillarine 2 fusionnée à la YFP (FIB2:YFP), permet de rendre visible la structure du nucléole en marquant le DFC par microscopie électronique (Figure 15A). FIB2 :YFP a été utilisée pour déterminer si certaines conditions de stress pouvaient modifier sa distribution nucléolaire. Ainsi, après huit heures de traitement à 37°C, la distribution de FIB2:YFP dans les cellules de feuilles de plantes de 3 semaines devient uniforme au sein du nucléole (Figure 15B-C, données obtenues avec l'aide de Claire Picart). Si les plantes sont replacées à 22°C, 24 heures sont nécessaires pour que la FIB2:YFP soit préférentiellement présente au niveau du DFC. Ce résultat démontre qu'un stress thermique affecte la localisation nucléolaire de la FIB2, mais suggère également une réorganisation de l'ensemble du nucléole, et aussi que la biogenèse des ribosomes pourrait être affectée.

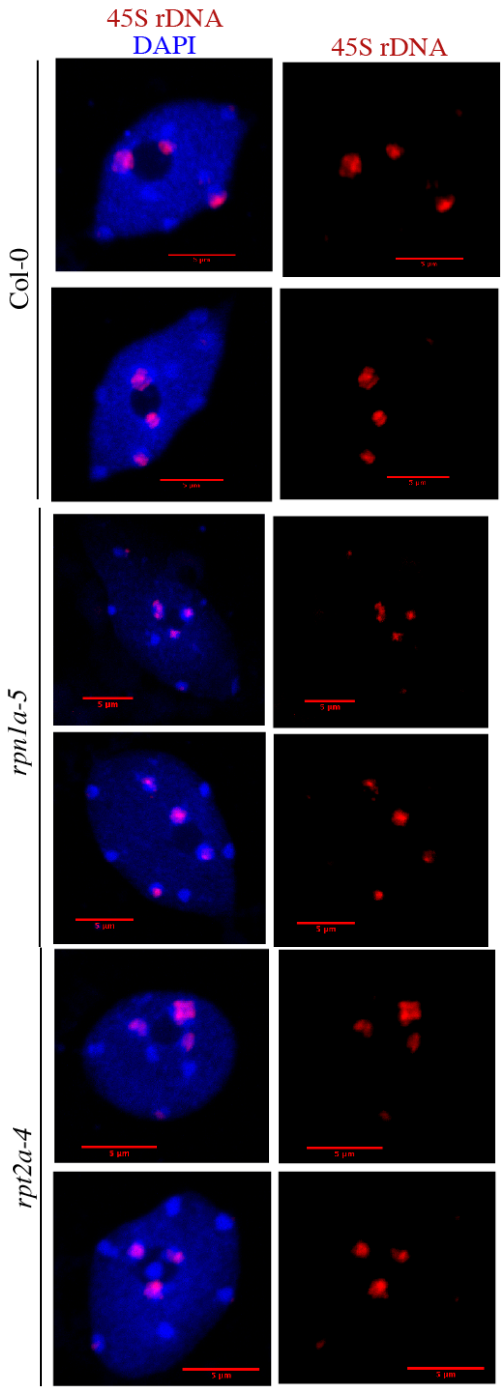
Biogenèse des ARNr et des ribosomes en cas de stress thermique

La technique d'extension d'amorces permet d'évaluer de manière quantitative le taux de transcription et de maturation des gènes d'ARNr et donc l'efficacité de la biogenèse des ribosomes. Ces analyses révèlent une augmentation des pré-ARNr qui peut soit être due à une augmentation de leur transcription, soit à un défaut d'efficacité de leur maturation, ou encore

A. Détection des variants d'ARNr 45S par RT-PCR



B. Détection des gènes d'ARNr 45S par FISH



C. Distribution des gènes d'ARNr 45S

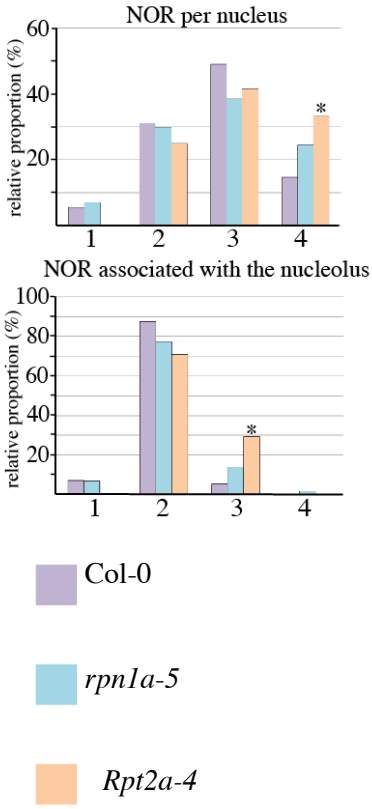
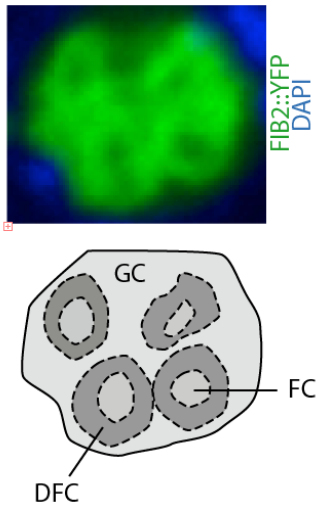


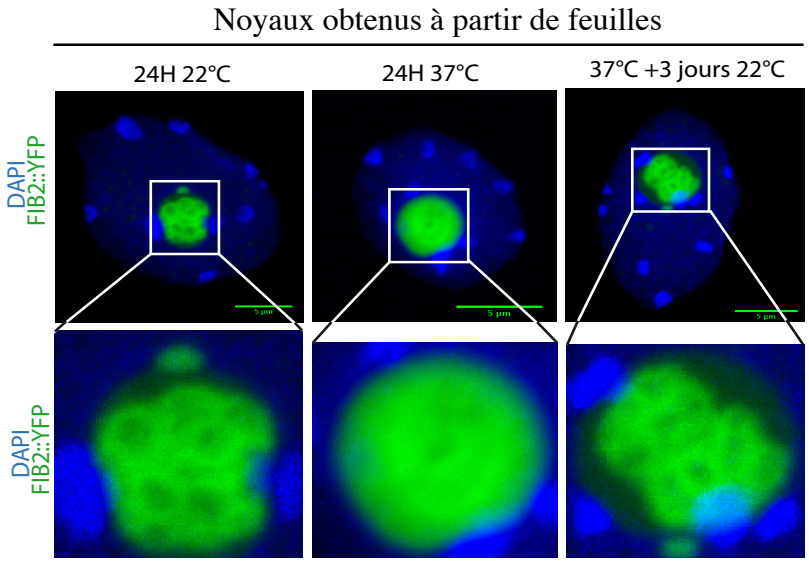
Figure 14: Analyse de l'organisation et l'expression des gènes d'ARNr dans des mutants du protéasome

A. Détection des variants d'ARNr 45S à partir d'ADNc de plantes sauvages (Col-0) ou mutantes (*nrp1a-5*). B. Détection des gènes d'ARNr par FISH à l'aide d'une sonde s'hybridant au niveau du TIS dans des mutants du protéasome. **C.** Histogrammes représentant le nombre de NOR par noyaux (haut) ou le nombre de NORs associés au nucléole (bas) dans les différents génotypes.

A. FIB2:YFP comme marqueur du DFC



B. Localisation de la FIB2:YFP en cas de stress thermique



C. Relocalisation de la FIB2:YFP en cas de stress thermique

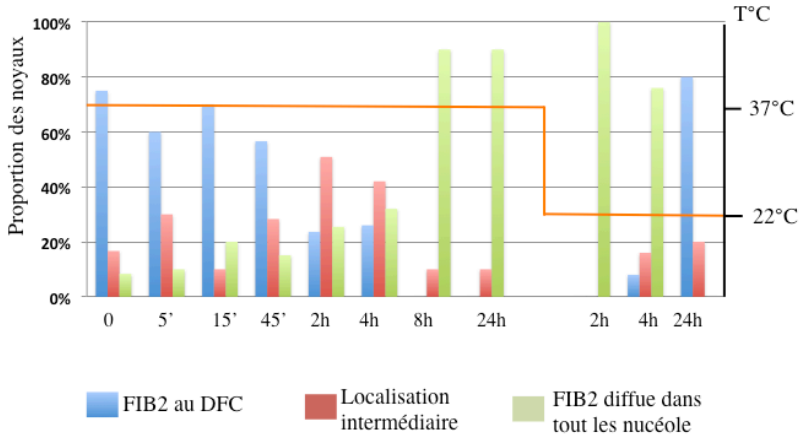


Figure 15: Le stress thermique affecte la structure nucléolaire et la biogenèse des ribosomes **A**. Détection de la FIB2:YFP (vert) dans un nucléole de plante sauvage Col-0. Le schéma associé correspond à l'interprétation de la localisation de FIB2 au sein du nucléole, à savoir au niveau du DFC. B. Détection de la FIB2:YFP (vert) dans des plantes sauvages stressées (24H 37°C) ou non (24H 22°C) 24h à 37°C, ou stressées 24h à 37°C puis replacée 3 jours à 22°C (37°C + 3 jours 22°C). L'ADN nucléaire est détecté au DAPI (Bleu). La barre d'échelle représente 5 μm. **C.** Histogrammes représentant le nombre de noyaux contenant un nucléole où la FIB2:YFP est distribuée uniquement dans le DFC (bleu), de manière homogène dans le nucléole (vert) ou ayant une distribution intermédiaire (rouge)..

les deux (Figure 16A, données générées par Nathalie Durut). Des analyses complémentaires réalisées par RT-PCR ont également montré une accumulation des ncARNr au niveau de la région promotrice des gènes d'ARNr (Figure 16B). Cette accumulation avait déjà été observée dans les mutants *nuc1* et *hda6*, où elle s'accompagne d'une augmentation des petits ARN et d'une modification du taux de méthylation (Earley et al. 2010; Pontvianne et al. 2010a). Nous ne savons pas encore si le nombre de petits ARN provenant des gènes d'ARNr varie en cas de stress, mais nous observons une augmentation importante de la méthylation en cas de stress thermique, et ce dans les 3 contextes de méthylation CG, CHG et CHH (Figure 16C). Ces données suggèrent une méthylation *de novo* des gènes d'ARNr qui peut être réalisée soit par la voie du RdDM et la méthyltransférase DRM2, soit par l'ADN méthyltransférase CMT2.

Vers une voie de séquestration nucléolaire de protéines en cas de stress?

Nous venons de voir que, comme dans les cellules animales, un stress peut provoquer une accumulation de ncrRNA chez *A. thaliana*. Cette observation suggère l'existence d'une voie de régulation par séquestration nucléolaire en cas de stress chez les plantes. Cette hypothèse est testée d'une part (i) en caractérisant les ncARNr (séquençage haut débit) et (ii) d'autre part en analysant le protéome du nucléole en cas de stress. Le premier point devrait permettre d'identifier des séquences préférentielles d'ARN, probablement structurées, qui pourraient être responsables des interactions ARN/protéines spécifiquement en cas de stress. Par le second point, on devrait déterminer les protéines associées au nucléole uniquement en cas de stress, et ce grâce à une approche de protéomique quantitative. Ce dernier point fait partie du projet de thèse de Charlotte Montacié (1ière année de thèse), et est réalisé en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique de l'IPHC de Strasbourg.

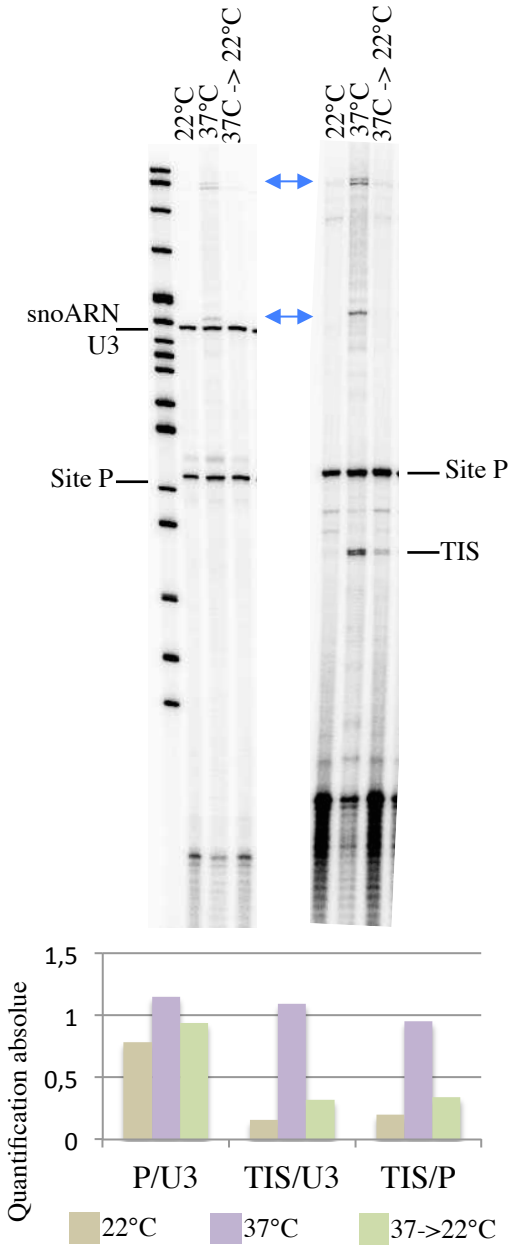
E. Les petits ARN nucléolaires

Ces dernières décennies, le rôle des petits ARN a révolutionné le monde de la biologie non seulement en modifiant ou faisant apparaître de nouvelles de voies de régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et traductionnelle, mais également en bouleversant nos habitudes techniques en génétique et biologie moléculaire. Toutefois, l'organisation, et le positionnement de ces voies dans le contexte spatio-temporel de la cellule, et plus particulièrement du noyau, restent peu connus. Le nucléole est le lieu où de nombreux complexes snRNP transitent pour y subir différentes étapes de maturation. C'est notamment le cas de certains snARN du complexe d'épissage ou de l'ARN du complexe télomérase (voir paragraphe II.A.4). Afin de mieux comprendre le rôle du nucléole dans la biogenèse de petits ARN, l'ensemble des petits ARN nucléaires et nucléolaires ont été identifiés par séquençage haut débit.

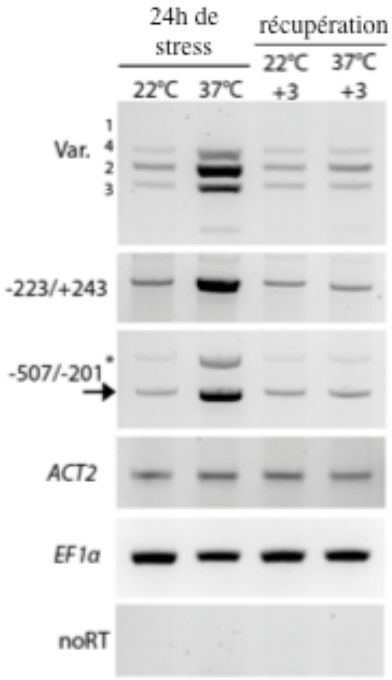
Identification des petits ARN nucléolaires

Les ARN nucléaires ou nucléolaires dont la taille varie de 18 et 80 nt ont été purifiés à partir de noyaux isolés par FANS (1 million) ou à partir de nucléoles isolés par FANoS (2 millions) (Figure 17A). Ces expériences ont été réalisées au laboratoire du Prof. Craig Pikaard lors d'un séjour d'une semaine à Indiana University (Bloomington, IN, USA) en juin 2014 et en collaboration avec Todd Blevins (aujourd'hui à l'institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg).

A. Analyse de la transcription et la maturation des gènes d'ARNr 45S par extension d'amorce



B. Détection des variants ou transcrits IGS d'ARNr 45S par RT-PCR



C. Analyse de la méthylation de la région flanquant le TIS des gènes d'ARNr 45S

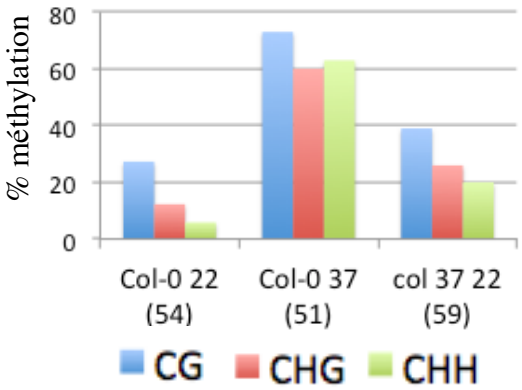


Figure 16: Le stress thermique affecte la transcription des gènes d'ARNr

A. Analyse du taux de transcription et de maturation au site P des pré-ARNr 45S par extension d'amorce à partir d'ARN totaux de plantes traitées ou non 24H à 37°C. Deux amorces ont été utilisées: le Site P pour détecter le pré-ARNr clivés au niveau du site de maturation P (A0) de la région 5'ETS et le TIS pour détecter les pré-ARNr45S au niveau du site d'initiation de la transcription. L'amorce snoARN U3 sert de contrôle de charge des ARN. Les doubles flèches bleues dénotent la présence de signaux additionnelles obtenus par l'amorce Site P. La quantification des signaux est présentée dans l'histogramme. **B** Détection des variants d'ARNr 45S ou de transcrits intergéniques à partir d'ADNc de plantes sauvages (Col-0) placées ou non a 37°C, puis remises 3 jours à 22°C. *ACT2* et *EF1α* servent de contrôle de charge. **C**. La méthylation des cytosines de la région promotrice des gènes d'ARNr 45S a été déterminée par séquençage au bisulfite dans des plantes sauvages stressées (Col-0 37) ou non (Col-0 22) 24h à 37°C, ou stressées 24h à 37°C puis replacées 3 jours à 22°C (col 37 22). Le nombre de séquences analysées est précisé entre parenthèse pour chaque condition analysée.

La taille des petits ARN permet de les attribuer à différentes voies de régulation dans lesquelles ils jouent un rôle crucial. L'analyse des séquences obtenues a donc été réalisée en séparant les populations des petits ARN en 3 catégories :

- les 21nt, correspondant essentiellement aux microARN
- les 23-24nt, représentant les siARN impliqués dans la voie du RdDM
- les petits ARN dont la taille est supérieure à 25nt.

Plusieurs types d'ARN sont regroupés dans la catégorie des petits ARN allant de 25 à 80nt comme les ARN issus de la maturation d'ARN non-codants comme les ARNt, les snoARN, les ARNr 5s et 45S, mais aussi d'ARNm en cours de dégradation. Afin de détecter les petits ARN enrichis dans le nucléole, les ARN nucléolaires ont été comparés aux petits ARN nucléaires. Seuls ceux dont le taux était deux fois supérieur dans le nucléole par rapport au noyau ont été considérés pour le reste de l'analyse.

Les tRNA fragments (tRFs): classe la plus enrichie des petits ARN

Parmi les ARN les plus enrichis se retrouvent les ARNt et les snoARN (figure 17B). Si la présence des snoARN était prévisible, la présence des ARNt était inattendue car le rôle du nucléole dans la transcription et/ou la maturation des ARNt chez les plantes n'est pas du tout connu. En revanche, chez la levure, il a été montré que le nucléole était le lieu de transcription et d'étapes de maturation précoce des ARNt (Phizicky and Hopper 2010). On sait aussi grâce au FISH et à l'identification des NADs que les gènes d'ARNt sont associés au nucléole dans les cellules humaines (Thompson et al. 2003; Nemeth et al. 2010; van Koningsbruggen et al. 2010). Nous avons observé que les gènes d'ARNt sont particulièrement enrichis dans les régions associées au nucléole chez *A. thaliana* appelées NADs pour Nucleolus-Associated chromatin Domains (voir section V). L'ensemble de ces données suggère donc un rôle important du nucléole dans l'organisation, la transcription et/ou la maturation des gènes d'ARNt chez les plantes. La localisation subnucléaire de l'ARN polymérase III n'est pas connue chez les plantes mais cette approche pourrait permettre de confirmer la connexion avec le nucléole.

Cas de l'ARNt Gly et son possible rôle dans la structure du nucléole ?

Les fragments d'ARNt (tRFs pour *tRNA-derived RNA fragments*) dérivent d'ARNt et forment une classe abondante de petits ARN (Loss-Morais et al. 2013). Parmi les tRFs enrichis dans le nucléole, beaucoup dérivent de l'ARNt gly, le plus abondant (Figure 18A). Celui-ci représente à lui seul près de 20% nucléaire de l'ensemble des ARN nucléolaire enrichies dans le nucléole compris entre 25 et 80nt et atteint 50% de cette classe d'ARN au sein du nucléole (Figure 18A). Cette surabondance suggère un rôle particulier de ces tRFs. Fin 2015, une étude a démontré l'implication d'un ARN non-codant (l'élément ALU ou B1) dans l'organisation structurelle du nucléole chez les mammifères (voir paragraphe II.A.3) (Caudron-Herger et al. 2015). L'ARN non-codant est structuré par plusieurs tiges-boucles et interagit avec la protéine Nucléoline. Des travaux antérieurs ont démontré que la Nucléoline interagissait de manière spécifique avec une structure tige-boucle possédant l'hexanucléotide UCCCGA dans la boucle (Figure 18D-F) (Allain et al. 2000b, 2000a; Bouvet et al. 2001). Les éléments ALU ou B1 ne sont pas présents dans le génome des plantes, mais tous deux sont issus de SINE qui eux-mêmes dériveraient de précurseurs d'ARNt dégénérés. De manière intéressante, la tige-boucle portant l'anticodon Gly est celui qui permet d'obtenir la tige-boucle la plus proche de l'hexanucléotide UCCCGA (Figure 18 B-C). L'ARNt Gly possédant l'anticodon CCC permet ainsi d'obtenir l'hexanucléotide ACCCAA au niveau de la boucle. Le second ARNt le plus abondant est celui codant pour l'ARNt Arg qui, avec l'anticodon CCG, forme l'hexanucléotide ACCGAA. Est-il possible que ces ARNt interagissent avec l'homologue de la nucléoline NUC1 chez *A. thaliana* pour permettre de structurer le

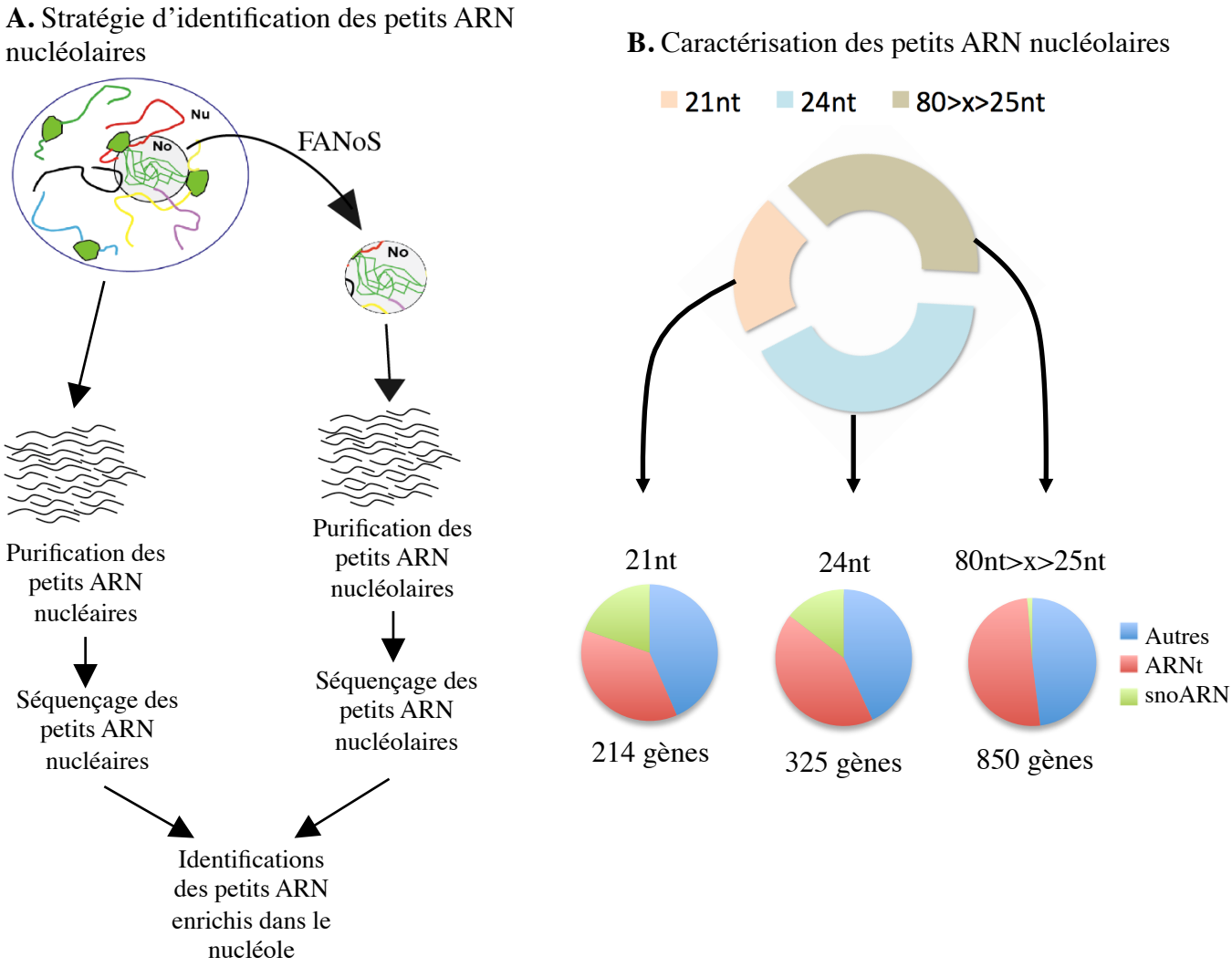
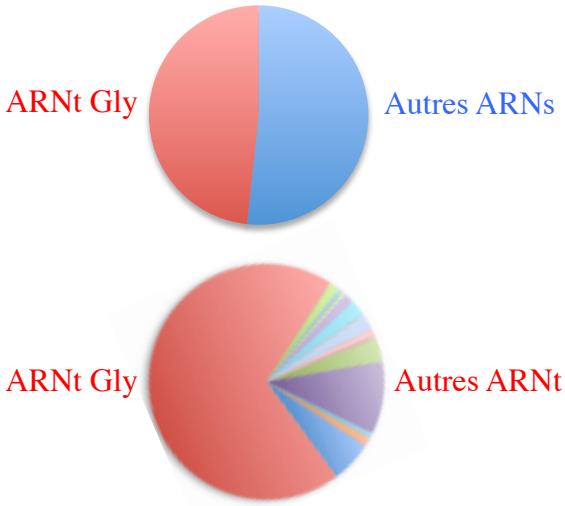
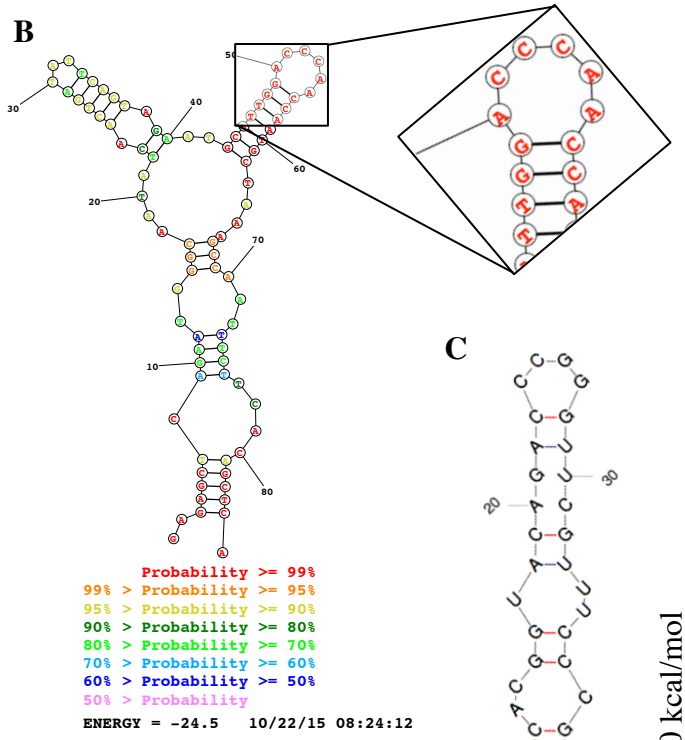


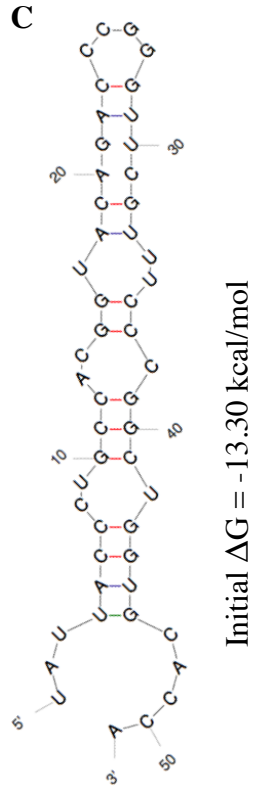
Figure 17: Caractérisation des petits ARN nucléolaires
A. Schéma décrivant le protocole ayant permis d'identifier les petits ARN nucléolaires. **B** Distribution par classe selon la taille des petits ARN enrichis dans le nucléole

A. Proportion de l'ARNt GLY parmi les ARN 25<x<80nt enrichies dans le nucléole

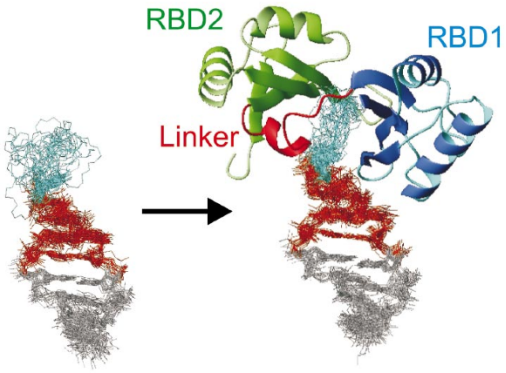


B-C. Prédiction de structures secondaires de l'ARNt Gly (B) ou de son fragment le plus abondant (C)





D. Interaction des 2 premiers RBDs de la Nucléoline avec une structure tige-boucle



E-F. Structure tige boucle ayant une forte affinité avec la Nucléoline

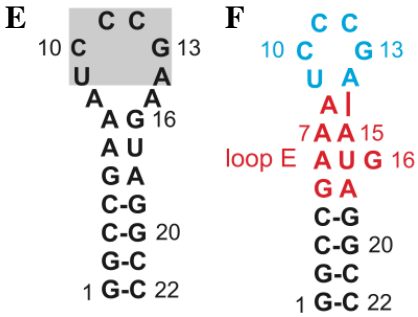


Figure 18: Caractérisation des tRFs nucléolaires
A. Proportions des lectures de séquençage haut débit provenant de tRFs gly parmi les tous les ARN compris entre 25 et 80nt enrichis dans le nucléole (haut) ou parmi l'ensemble des tRFs enrichis dans le nucléole (bas). **B-C**. Prédiction des structures 2D obtenues par mfold de l'ARNt gly mature (B) ou de son tRF le plus abondant dans el nucléole (C). **D**. Structure 3D des deux domaines RBD de la nucléoline humaine avec le substrat présenté en (F), publié dans (Allain et al., 2000). **E-F**. Deux structures tige-boucle ayant une forte affinité pour la Nucléoline humaine, décrite dans (Bouvet et al., 2001).

nucléole ? Une collaboration avec l'équipe de Laurence Drouard (IBMP, Strasbourg), spécialiste des ARNt chez les plantes, est actuellement en cours pour répondre à cette question. Le fait que l'absence de NUC1 chez *A. thaliana* provoque, comme au sein des cellules humaines, une déstructuration du nucléole est un nouvel argument en faveur de cette hypothèse.

VI. Régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire : une nouvelle voie de régulation des gènes ?

A. Le nucléole ne contient pas uniquement les gènes d'ARNr

Dans les cellules humaines, l'identification des Nucleolus-Associated chromatin Domains (NADs) a révélé la présence de certaines classes de gènes (les NAD-gènes), en plus de séquences répétées. Les gènes codant les protéines à doigt de zinc, les récepteurs olfactifs et les défensines sont en effet significativement enrichis dans les NAD-gènes (4 fois, 5 fois et 16 fois, respectivement) (van Koningsbruggen et al. 2010; Nemeth et al. 2010). Les NAD-gènes sont pour la plupart faiblement exprimés dans le type de cellules utilisées dans ces études.

Chez les plantes, certaines observations laissent entrevoir un rôle du nucléole dans l'organisation nucléaire. Tout d'abord, certains centromères des chromosomes qui ne contiennent pas de NORs peuvent s'associer avec le nucléole. Ensuite, une couche composée d'hétérochromatine est généralement visible autour du nucléole. Connue sous le nom de « nucleolar shell », cette couche ne correspond pas uniquement aux gènes d'ARNr. Mais si ces observations semblent indiquer la présence de chromatine à la périphérie du nucléole, les colorations des noyaux au DAPI permettent de déterminer la position du nucléole justement parce qu'il apparaît comme un trou noir… donc dépourvu d'ADN. L'intensité de fluorescence émise par le DAPI étant quantifiable, cela permet d'établir que le nucléole contient aussi de l'ADN à une concentration avoisinant 20-25% de celle du nucléoplasme. Il est probable que cet ADN nucléolaire, comme dans les cellules humaines, contienne d'autres gènes que les gènes d'ARNr activement transcrits. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le contenu en ADN de nucléoles purifiés.

Manuscrit : Identification of nucleolus-associated chromatin domains in *A. thaliana* reveals the role of the nucleolus in 3D genome organisation and telomere protection

Les travaux ayant permis de déterminer la composition des NADs dans un contexte sauvage, ou muté pour le gène codant la Nucléoline 1 sont actuellement en révision dans le journal *Cell Reports*.

Identification of nucleolus-associated chromatin domains in *A. thaliana* reveals the role of the nucleolus in 3D genome organisation and telomere protection

Frédéric Pontvianne[1,2,*,#], Marie-Christine Carpentier[1,2], Nathalie Durut[1,2], Veronika Pavlištová, Hugues Parrinello[4], Marine Rohmer[4], Craig S, Pikaard[5,6], Jiri Fajkus[3]* and Julio Saez-Vasquez[1,2]*

[1] CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR5096, F-66860, Perpignan, France
[2]Université de Perpignan Via Domitia, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR5096, F-66860, Perpignan, France
[3]CEITEC-Central European Institute of Technology and Faculty of Science, Masaryk University, CZ-62500 Brno, Czech Republic
[4]Montpellier GenomiX, Montpellier Cedex 5, France
[5]Department of Biology and Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA
[6] Howard Hughes Medical Institute, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA

*co-senior authors
#corresponding author: fpontvia@univ-perp.fr;

Running title : Plant nucleolus in nuclear organisation

Keywords : nucleolus, nuclear architecture, telomere, nucleolus-associated chromatin domains, heterochromatin

Abstract

The nucleolus is the site of ribosomal RNA (rRNA) gene transcription, rRNA processing and ribosome biogenesis. However, the nucleolus contains much more than rRNA genes. Using a technique designed to isolate nucleoli by Fluorescence Assisted Cell Sorting (FACS), we have identified Nucleolus-Associated Chromatin Domains (NADs) from *Arabidopsis thaliana* leaves. We show that the short arm of chromosome 4, containing actively transcribed rRNA genes, entirely associates with the nucleolus, together with genomic regions flanking the telomeres. NADs are essentially composed of genomic regions with silent chromatin signatures. In addition to rRNA genes, NADs also contain 11% of *A. thaliana* transposable elements (TEs) and 3% of *A. thaliana* genes. Analyses in a *nucleolin 1* (*nuc1*) null mutant reveal how NAD composition is dependent on rRNA gene expression and nucleolar structure. Telomere clustering in the nucleolus is altered in the *nuc1* mutant, where telomeres are also shortened, which suggests a role for the nucleolus in telomere maintenance and/or protection. Finally, our analyses reveal that a large fraction of non-rRNA, genic NADs are not expressed. Because RNA polymerase II (Pol II) is excluded from the nucleolus, our data suggest that the nucleolus may silence these latter genes by sequestering them away from Pol II.

Introduction

A major mechanism of transcriptional regulation is the modification of gene accessibility to transcription factors and RNA polymerases. Gene accessibility depends on local chromatin structure but also on its subnuclear localization (i.e. a gene's nuclear context). In recent years, a priority of the research community was to study local chromatin structure and its impact on gene expression. Global genome-wide approaches were routinely used to identify the precise chromatin context for each gene (Filion et al., 2010; Kharchenko et al., 2011; Roudier et al., 2011; Roy et al., 2010; Wang et al., 2008). These approaches led to the identification of several chromatin states that correlate with the expression level of genes therein (Bickmore and van Steensel, 2013; Sequeira-Mendes and Gutierrez, 2015). However, nuclear context is also very important to fully understand transcriptional regulation. The composition of the nucleus is not homogeneous and contains several types of subnuclear domain with specific functions (i.e., Cajal bodies, nuclear speckles, the nucleolus and others). Therefore, the position of a gene with respect to a nuclear pore, nuclear lamina and the nucleolus, as well as inter or intra chromosome interactions, affects its transcriptional regulation (Bickmore and van Steensel, 2013).

In mammalian cells, large portions of the genome associate with the network of nuclear lamina at the periphery of the nucleus and are identified as Lamina-Associated Domains (LADs). LADs are essentially composed of regions with silent chromatin signatures and can represent up to 35% of the nuclear genome (Guelen et al., 2008). Some chromosome regions also interact with the nucleolus, the largest nuclear body. The nucleolus is a direct consequence of ribosome biogenesis, but it is also a multifunctional body implicated in other mechanisms including stress sensing, cell cycle progression, viral replication and RNP biogenesis (Boisvert et al., 2007; Boulon et al., 2010; Pederson, 2011). Nucleolus-Associated Chromatin Domains (NADs) represent several megabases of the human genome from all 23 chromosomes, which also display silent chromatin signatures (van Koningsbruggen et al., 2010; Nemeth et al., 2010). Interestingly, a first comparison of NADs and LADs revealed a substantial overlap. Further cell biology approaches revealed that a significant portion of the LADs that do not relocate to the nuclear periphery after mitosis instead associate with the nucleolus (Kind et al., 2013, 2015). An important particularity of the nucleolus is that it creates a large domain within the nucleus from which RNA polymerase II (RNA pol II) is excluded. This is true in all eukaryotes, including plants (Figure 1A), but has not so far been explored by the research community (Schubert and Weisshart, 2015). It is tempting to speculate that some genes could be physically sequestered in the nucleolus, making them inaccessible to RNA pol II and therefore silenced. It is clear that both the nuclear periphery and the nucleolus are important platforms for genome organization.

In plant cells neither LADs nor NADs have been identified so far. Genes that encode proteins homologous to components of nuclear lamina could not be identified. However, LINC (LIttle NuClei, also called CRWN) proteins share some characteristics with the lamina, including coiled-coil domains (Dittmer et al., 2007). The composition of the LINC complex was recently characterized in plants (Graumann and Evans, 2010, 2011; Tatout et al., 2014). However, the link between this complex and chromatin remains to be demonstrated.

The role of the nucleolus in rRNA gene transcription and organization has been studied extensively (Benoit et al., 2013; Grummt and Langst, 2013; McStay and Grummt, 2008; Tucker et al., 2010). In each cell, active and inactive rRNA genes coexist and their ratio varies depending on the needs of the cell. Most inactive copies of rRNA genes are excluded from the nucleolus and are thus inaccessible to RNA pol I (Pontvianne et al., 2013). Because rRNA genes are arranged in large tandem arrays called Nucleolus Organizer Regions (NORs),

a change in NOR transcriptional activity modifies its subnuclear localisation and should therefore at least partially affect the global chromosome organization within the nucleus.

Using a technique designed to isolate nucleoli from plant tissue, we have identified genomic NADs from *A. thaliana* leaves. We show here that NADs are mainly composed of transposable elements (TEs), but the NADs also contain genes that are mainly weakly expressed or unexpressed in leaves. Finally, our analyses of NADs in the *nucleolin 1* (*nuc1*) mutant reveal an unexpected role of the nucleolus in telomere biology, and suggest a potential new way to regulate gene transcription by nucleolar sequestration.

RESULTS

1. Identification of NADs in *A. thaliana*

DNA staining by DAPI allows the visualization of nuclear DNA and its distribution within the nucleus. In three-week-old *A. thaliana* leaves, centromeres can easily be identified because of their high degree of chromatin compaction. On the other hand, euchromatin is less compact and the staining signal is therefore less bright. DAPI staining of nuclei also allows one to identify the nucleolus, which appears as a black cavity. However, measurements of DAPI signal intensity indicate that DNA is indeed present in the nucleolus, but at a concentration around three times lower than in the nucleoplasm (excluding centromeres) (Figure 1A). To characterize this nucleolar DNA, we took advantage of a protocol that we recently developed for the purification of nucleoli by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). In this protocol a nucleolar protein, Fibrillarin, is fused to yellow fluorescent protein (FIB2:YFP) and stably expressed in wild-type Col-0 plants to specifically mark nucleoli (Pontvianne et al., 2013). Nucleoli isolated by Fluorescence-Activated Nucleolar Sorting (FANoS) were then stained by DAPI to improve detection of the nucleolar DNA (Figure 1B). As in the nucleoplasm, nucleolar DNA is not homogeneously distributed in the nucleolus and thus stronger DAPI-stained signals are visible. Because the nucleolus forms around actively transcribed rRNA genes, we expected to find rRNA genes in the nucleolar DNA. We therefore performed DNA-Fluorescent *In Situ* Hyridization (FISH) using a probe flanking the transcription initiation site of rRNA genes to visualize rRNA genes (Figure 1B). All nucleoli contain a large quantity of rRNA genes, as expected, but rDNA-FISH signals do not completely overlap with DAPI-stained nucleolar DNA. We conclude that nucleolar DNA does not consist solely of rRNA genes.

To determine the sequence of nucleolar DNA, two sets of 10^6 nucleoli and two sets of 5.10^5 nuclei from three week-old plants leaves were isolated by FANoS. The nuclear or nucleolar DNA was then purified, sequenced and reads were mapped to the Arabidopsis TAIR10 reference genome. To identify genomic regions present in the nucleolus, we compared read densities between the nuclear and the nucleolar DNA for each of the two replicates. The nuclear fraction served as an input control to evaluate the relative enrichment of genomic regions in the nucleolar DNA. Genomic regions with a nucleolar versus nuclear (No/N) fold enrichment ratio greater than 2 in both replicates were identified as nucleolus-associated chromatin domains (NADs) (Figure 1C). Excluding rRNA genes, NADs represent 4,2% of the genome (~5.7 Mb). Around 30% of NADs correspond to genes, 35% correspond to TEs and the rest correspond to intergenic regions (Figure 1D).

The No/N fold enrichment ratio was plotted along each of the five chromosomes in 100-kilobase windows to detect whether specific genomic regions associate with the nucleolus more than others (Figure 1E). In *A. thaliana*, 45S rRNA genes are arranged in tandem repeat arrays in NORs located on the left arms of chromosomes 2 and 4 (Figure 1E,

NOR2 and NOR4). In *A. thaliana* leaves only NOR4 associates with the nucleolus and is actively transcribed, whereas NOR2 is inactive and is excluded from the nucleolus (Chandrasekhara et al., 2016; Fransz et al., 2002; Pontvianne et al., 2013). This genomic configuration and selective expression of 45S rRNA genes is reflected in the enrichment of NADs along the left arm of chromosome 4 and their near absence from the left arm of chromosome 2 (Figure 1E). In fact, it is the entire left arm of chromosome 4 (or Chr4S for "Chr 4 short arm"), including its pericentromeric and centromeric regions, that associates with the nucleolus (Figure 1E). In contrast, the left arm of chromosome 2 behaves like chromosomes 1, 3 and 5, which do not harbor NORs. Subtelomeric regions from all the 5 chromosomes are also enriched in the nucleolus. This latter observation confirms previous work demonstrating that telomeres cluster in the nucleolus (Armstrong et al., 2001).

2. NADs are enriched in inactive chromatin marks and TEs

We took advantage of published epigenomic data to characterize the type of chromatin that associates with NADs. Among the nine chromatin states defined based on their histone marks and histone variant content (Sequeira-Mendes et al., 2014), we found that four of them were statistically enriched in NADs (Figure 2A). This includes chromatin states 8 and 9, which show an enrichment for CG methylation, and for silent chromatin marks histone H3 lysine 9 dimethylation and histone H3 lysine 27 monomethylation (H3K9me2 and H3K27me1) (Sequeira-Mendes et al., 2014). Chromatin states 8 and 9 are typically associated with TEs and intergenic regions. In addition, chromatin states 4 and 5, which are characterized by high levels of H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), are also enriched in NADs. While almost no genes (other than TEs) are present in chromatin states 8 and 9, some are present in chromatin states 4 and 5. We therefore analysed the relative expression of polyA+ RNA from genes in these different chromatin states to establish a possible correlation between NADs and gene expression (Durut et al., 2014). All four of the chromatin states that are enriched in NADs (4, 5, 8 and 9) correspond to genomic regions depleted in actively transcribed genes (Figure 2B) (Sequeira-Mendes et al., 2014).

Because NADs are enriched in TEs, we examined the relative contribution of each TE superfamily to NADs. 3640 TEs were identified with a No/N fold enrichment ratio greater than 2 (NAD-TEs; Supplemental Table 1). In general, no TE superfamily is particularly enriched (Figure 2C). *DNA/Mariner*, *DNA/Pogo*, *DNA/Tc1* and *pseudo-LINE* elements are slightly overrepresented, while *LTR/Copia* or *SINE* superfamilies are underrepresented. The biased presence of particular TE superfamilies in NADs is probably a consequence of their relative abundance in peri-centromeric or knob regions (Figure 2D).

3. Description of the genes present in NADs.

Although a large portion of NAD loci correspond to TEs, there are also many genes. Using the Araport11 annotation database, and excluding 317 Araport11-referenced TEs and 4 rRNA genes, a total of 907 genes were identified as NAD-genes, which represent around 3% of all genes (Supplemental Table 2). The relative position of NAD-genes along all five chromosomes follows the general distribution of NADs, being enriched in subtelomeric regions and in the short arm of chromosome 4 (Figure 3A). NAD-gene distribution among Eukaryotic orthologous groups of proteins (KOG) was analysed. Almost all types of KOGs are represented in NAD-genes, with only a slight enrichment of the category "cell mobility". However, only 21 genes belong to this particular category and the 4,7% proportion observed here is only due to the association of 1 gene and is therefore not significant. Genes implicated in "translation, ribosomal structure and biogenesis", and which are thus linked to nucleolar

function, are not enriched in NAD-genes either. However, two other categories of genes are particularly enriched: pseudogenes and tRNA genes (Figure 3B). Among the 915 pseudogenes referenced in the *A. thaliana* genome, 72 (7,9%) are present in NAD-genes. Moreover, 16,5% of tRNA genes belong to NADs. Interestingly, almost all tRNA isoacceptor types are present in NADs, with the exception of tRNA-His which is the smallest tRNA gene family in *A. thaliana* (Figure 3D). Because RNA pol II is excluded from the nucleolus, we expect low or unexpressed genes to preferentially compose NAD-genes. Global nuclear gene and NAD-gene expression analyses did indeed reveal a bias in expression that supports our hypothesis (Figure 3C).

4. Impact of NOR positioning and nucleolus structure on NAD composition

In wild-type *A. thaliana* leaves, only NOR4 interacts with the nucleolus while NOR2, composed of inactive rRNA genes, is excluded from the nucleolar periphery. In null mutants for the *NUCLEOLIN 1* gene (*nuc1*), NOR2 and NOR4 both associate with the nucleolus and the NOR2 rRNA genes that are normally silenced in wild-type leaves are derepressed (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010). *VAR1* designates a class of rRNA genes that represent 50% of the entire set of rRNA genes. Because *VAR1* rRNA genes are present on the inactive NOR2 they are excluded from the nucleolus, which explains the lack of *VAR1* gene expression in wild-type Col-0 (Chandrasekhara et al., 2016; Pontvianne et al., 2010). However, we previously demonstrated that *VAR1* rRNA genes are expressed in *nuc1* mutants (Pontvianne et al., 2010). Here, we show using PCR analyses of FACS-isolated nuclear or nucleolar DNA that this large pool of rRNA genes indeed associate with the nucleolus in the *nuc1* mutant (Figure 4A). To test the impact of NOR2 association with the nucleolus on NAD composition, we isolated and sequenced the DNA from FACS-isolated nuclei or nucleoli of *nuc1*. In wild-type Col-0 we demonstrated that chromosome 4 harbours the largest proportion of NADs (52%) due to the association of Chr4S with the nucleolus, followed by chromosome 2 (30%) (Figure 4B). However, in the *nuc1* mutant the distribution of NADs was disrupted across all five chromosomes (Figure 4B). Chromosome 2 is now the most represented in NADs (36%), followed by chromosome 4 (21%). Interestingly, between wild-type Col-0 and *nuc1*, the global proportion of chromosomes 1, 3 and 5 in NADs doubles from around 18% in Col-0 (each representing ~6%) to 42% in *nuc1* mutant (each representing ~14%). The global distribution of *nuc1* nucleolar versus nuclear DNA reveals that both short arms of chromosomes 2 and 4 (Chr2S and Chr4S) now associate with the nucleolus (Figure 4C). This observation correlates with the transcriptionally active state of both NOR2 and NOR4 in *nuc1* (Figure 4A).

The pericentromeric and centromeric regions of chromosomes 1, 3 and 5 become enriched in the *nuc1* mutant (Figure 4D). Although the *nuc1* mutant was analysed in several studies, no such bias in centromere positioning have been reported so far. Their association with the nucleolus is not linked to rRNA gene expression or organization because they do not possess 45S rRNA genes. However, Modullo, the nucleolin homolog in *Drosophila melanogaster*, is required for centromere sequestration to the periphery of the nucleolus (Padeken et al., 2013). Because centromeres are easily detected by DAPI staining, we assessed their relative positions with respect to the nucleolus in wild-type Col-0 and in *nuc1-2* mutant nuclei from three-week-old leaves (Figure 4E-F). A bias can be seen in this distribution in the *nuc1* mutant, where more centromeres are associated with the nucleolus (Figure 4E). In 7% of cases a strong DAPI-stained signal (usually corresponding to a centromere) can be detected inside Col-0 nucleoli; by contrast, more than 80% of *nuc1* nucleoli harbour these centromere signatures (Figure 4F). The altered centromere positioning

in *nuc1* mutant nuclei suggests, as in *D. melanogaster*, a role for NUC1 in heterochromatin distribution in the nucleus.

5. NAD-gene depletion in the *nuc1* mutant

822 NAD-TEs (Supplemental Table 3) and 117 NAD-genes (Supplemental Table 4) can be identified in *nuc1* with a No/N fold enrichment ratio greater than 2. Their distribution along the five chromosomes (Figure 5A) is quite different from that seen in wild-type Col-0 (see Figure 3A). While 65% of Col-0 NAD-genes were distributed on chromosome 4, only 20% of *nuc1* NAD-genes are present on this chromosome. By contrast, only 13% of Col-0 NAD-genes were found on chromosome 2, but this proportion increased to 46% in the *nuc1* mutant. Nonetheless, the NAD-gene pool between wild-type Col-0 and *nuc1* overlaps significantly, since 80% of *nuc1* NAD-genes are also NAD-genes in Col-0 (Figure 5B). To further characterize NAD-genes that strongly associate with the nucleolus, we identified NAD-genes in either wild-type Col-0 or *nuc1* that have a No/N fold enrichment ratio greater than 3 (Figure 5C). In both cases about 100 NAD-genes were identified, and 51 were shared in both genotypes. Among these common loci are tRNA genes (8) and pseudogenes (21), demonstrating their strong, reproducible association with the nucleolus, even in the *nuc1* mutant context where nucleolar structure is disrupted.

Because RNA pol II is excluded from the nucleolus, we hypothesized that the physical association of NAD-genes with the nucleolus may help regulate their transcription. We thus took advantage of the fact that several hundred NAD-genes detected in Col-0 do not associate with the nucleolus in the *nuc1* mutant to examine the impact of these changes on NAD-gene expression. RNA deep sequencing analyses of Col-0 versus the *nuc1* mutant from three-week-old leaves were performed in triplicate, allowing us to identify 100 up-regulated genes in the *nuc1* mutant (Figure 5C). Among these 100 up-regulated genes, 4 were identified as NAD-genes in Col-0 but not in the *nuc1* mutant. Three of these 4 genes, which are all on chromosome 4, are shown in Figure 5D-F; they encode for a P-loop nucleoside triphosphate hydrolase (AT4G05380), a WRKY transcription factor (AT4G01720) and a pseudogene (AT4G08093), respectively. Note that only genes considered up-regulated in *nuc1* by cuffdiff were taken into consideration here. However, more transcripts can be detected along the some area of the Chr4S whose nucleolar association in *nuc1* mutant is much weaker than in wild-type (Supplemental Figure 1). These observations reinforce a possible link between gene silencing and nucleolus association.

6. Nucleolar clustering of telomeres is disrupted in the *nuc1* mutant

In the global distribution of NADs along all five chromosomes (Figure 1C), a convex pattern is observed, meaning that sub-telomeric regions are largely enriched in the nucleolus. This observation corroborates previous reports showing the physical association of telomeres with the nucleolus in nuclei from *A. thaliana* leaves (Armstrong et al., 2001; Fransz et al., 2002). Interestingly, the sub-telomeric nucleolar association is not as strong in the *nuc1* mutant compared to wild-type Col-0, especially for chromosomes 1, 3 and 5 (Figure 4C). This observation is confirmed by the analysis of the relative enrichment in the nucleolus of genomic regions in the *nuc1* mutant compared to wild-type Col-0 (Figure 6A). The latter distribution pattern is concave, demonstrating the enrichment of the centromeric and pericentromeric regions, but also the depletion of sub-telomeric regions in the *nuc1* mutant.

These deep sequencing data strongly suggest that nucleolar clustering of telomeres is disrupted in the *nuc1* mutant. To test this hypothesis cytologically, we analysed the telomere distribution in wild-type Col-0 and in *nuc1* leaves by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) using telomere-specific probes (Figure 6 B-D). As expected, most of the FISH signals

are distributed within the nucleolus in wild-type Col-0 nuclei (Figure 6B). However, this distribution is perturbed in the *nuc1* mutant: although some FISH signals remain associated with the nucleolus, nearly half of them fail to cluster in the nucleolus (Figure 6C). Quantification of FISH signals reveals that 85% associate with the nucleolus in wild-type Col-0 versus 53% in the *nuc1* mutant (Figure 6D). Importantly, telomeres that do not associate with the nucleolus in *nuc1* are not clustered in any other nucleoplasmic subcompartment.

7. Mutations in *NUC1* cause telomere shortening on all chromosome arms

The biological function of telomere nucleolar clustering remains unknown, but this clustering could have an impact on their maintenance. The analysis of terminal restriction fragments (TRF) allows one to determine global telomere size. We used this technique to determine telomere size in wild-type Col-0 and in *nuc1* mutants. In addition, telomere size was also analysed in a mutant for the *NUC2* gene, which encodes for another nucleolin-like protein whose function differs from NUC1 (Durut et al., 2014). In addition, telomere size was analysed in mutants for genes encoding FASCIATA1 (*fas1-4*) and FASCIATA2 (*fas2-4*), which mediate replication-dependant histone deposition and whose respective disruption was shown to strongly reduce telomere size (Mozgova et al., 2010). Compared to wild-type Col-0, a significant TRF length reduction was observed in both *nuc1* mutant alleles; this reduction is comparable to that observed in *fas1* and *fas2* mutants (Figure 7A). However, no difference is observed between wild-type Col-0, the *nuc2* mutant or the complemented *nuc2* mutant, demonstrating the specific effect of the *nuc1* mutations.

We demonstrated previously the importance of NUC1 on rRNA gene regulation, which occurs in NOR2 and 4 (Pontvianne et al., 2007, 2010). In *A. thaliana*, the terminal rRNA genes from NOR2 and 4 are directly capped by telomere repeats (Copenhaver and Pikaard, 1996). To determine if telomeres of NOR-bearing-chromosomes are differentially affected, we used a PCR-based method called PETRA (primer extension telomere repeat amplification) (Heacock et al., 2004) on multiple chromosome arms (Figure 7B-E). In agreement with the data from TRF, telomeres on all studied chromosome arms display a ~30% loss of length in the *nuc1* mutants compared to wild-type Col-0, which is equivalent to the loss observed in *fas1* and *fas2* mutants. Together, these observations demonstrate that telomeres from all chromosome arms are shortened in *nuc1* and this process is thus not dependent on the presence of rRNA genes near the affected telomere.

DISCUSSION

The impact of NOR-nucleolus associations on nuclear architecture

In mammalian cells the nuclear distribution of DNA is governed by individual chromosome territories (Gibcus and Dekker, 2013). Although chromosome territories can be seen in *A. thaliana* cells, their distribution in the nucleus is stochastic, with the exception of NOR-bearing-chromosomes 2 and 4 that associate more randomly (Pecinka et al., 2004). Only NOR4, composed of rRNA gene variants *VAR2* and *VAR3*, associates with the nucleolus (Pontvianne et al., 2013). We demonstrate here that not only NOR4, but also the entire Chr4S, as well as its centromeric and pericentromeric regions associate with the nucleolus. Consequently, this entire region is typically confined to a specific nuclear compartment. Interestingly, data obtained by chromosome conformation capture indicates that this region acts as an interaction insulator (Feng et al., 2014; Grob et al., 2013). Our results suggest that nucleolus association provokes this insulation.

Coincident with NOR2 rRNA gene expression in certain mutant backgrounds, the NOR2 genomic region also associates with the nucleolus. This is true in mutants for genes encoding factors implicated in rRNA genes dosage control, such as mutants for histone modifiers (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2012). Here, we analysed the impact on NOR2 nucleolar association of the nucleolin 1 mutant *nuc1* (Pontvianne et al., 2007, 2010). As observed for NOR4 in wild-type Col-0, NOR2 rRNA gene expression provokes its nucleolar association, but also the nucleolar association of Chr2S, including its centromeric and pericentromeric region. Our data demonstrate that NOR-nucleolus associations affect global chromosome organisation within the nucleus.

Although Chr4S and/or Chr2S associate with the nucleolus under certain conditions, not all genes present in these genomic regions are necessarily associated with the nucleolus. Loops emanating from Chr4S and oriented within the interior of the nucleus probably exist, allowing actively expressed genes to access a nearby nuclear environment compatible with active gene expression, as previously described (Feng et al., 2014; Fransz et al., 2002).

Telomere maintenance and/or protection require their physical association with the nucleolus

In *A. thaliana*, telomeres tend to associate with the nucleolus (Armstrong et al., 2001; Fransz et al., 2002). Consequently, we expect subtelomeric regions to be near the nucleolus, as shown by DNA-FISH previously (Schubert et al., 2012). Our data demonstrate that at least 100 kb of each region flanking the telomeres strongly associates with the nucleolus. This association may have an impact on genes present in these regions. 39% of highly enriched NAD-genes in Col-0 (No/N > 3) are distributed in these subtelomeric regions, while they represent less than 1% of the genome. The biological function of telomere nucleolar clustering remains unknown, but some studies have indicated a link between telomere biology and the nucleolus (Dvorackova et al., 2015). In human cells, the telomerase reverse transcriptase (TERT), which catalyzes reverse transcription of the telomerase RNA template into telomeric repeats, is activated in the nucleolus during S phase (Jady et al., 2006; Lee et al., 2014; Tomlinson et al., 2006). In *A. thaliana* a preferential nucleolar accumulation of telomere repeat binding (TRB) MYB-like proteins was shown. In addition, the telomerase RNA-binding protein dyskerin, AtNAP57/CBF5, and AtTERT accumulate in the plant nucleolus (Kannan et al., 2008; Lermontova et al., 2007).

We found that the telomere-nucleolus association is strongly disrupted in *nuc1* mutants and that telomeres are shortened. Previous work demonstrated the important role of nucleolin in rRNA organization and biogenesis (reviewed in (Durut and Saez-Vasquez, 2015)). However, all telomeres are affected in *nuc1,* so the proximity of rRNA genes on NOR-bearing chromosome cannot explain telomere shortening. Subnucleolar structures show profound changes in *nuc1* mutants, such as the loss of fibrillar centers (FC), reductions in the dense fibrillar component (DFC), as well as an alteration of the granular component (GC) (Pontvianne et al., 2007). FC, DFC and GC are subnucleolar structures that are conserved in most Eukaryotes and that reflect various steps of ribosome biogenesis (Stepinski, 2014; Thiry and Lafontaine, 2005). The nucleolar disorganization observed in *nuc1* mutants reflects the impact of these mutations on rRNA gene regulation. But *nuc1* mutants also affect non-ribosomal nucleolar functions, including a potential role for NUC1 in telomere biology. Whether telomere shortening is a cause or a consequence of telomere mislocalisation is an open question. However, telomere clustering is not specific to *A. thaliana*. In budding yeast, telomeres cluster in foci at the nuclear periphery in cycling cells (Meister and Taddei, 2013). In quiescent cells, a lack of carbon source is followed by telomeres clustering into a unique focus, in the centre of the nucleus (Guidi et al., 2015). Although we do not have direct evidence to show it, these data argue in favour of a model where telomere shortening is a

consequence of telomere mislocalisation. However, our work combined with previous studies strongly suggests a role for the nucleolus in the biology of telomeres.

Potential new mechanism of gene regulation by nucleolar sequestration

Our data have allowed the comprehensive identification of genetic loci that associate with the nucleolus (NADs), including many genes (NAD-genes). The majority of NADs correspond to repeat elements such as TEs that are transcriptionally silenced by repressive histone modifications and DNA methylation (Ito and Kakutani, 2014). Whether the association of these loci with the nucleolus participates in transcriptional repression is an open question. However, because only a fraction of TEs associate with the nucleolus, being in a NAD is certainly not a prerequisite for silencing. Our data also demonstrate the presence of genes other than in TEs in NADs. Interestingly, the most enriched non-rRNA gene loci are pseudogenes. Because they potentially encode for truncated or non-functional proteins, keeping them silent is perhaps the best way to prevent a potential deleterious effect of their expression. Importantly, pseudogenes remain highly enriched in the nucleolus of *nuc1* mutant cells, although its structure is greatly disrupted (Figure 5).

Genes encoding pre-tRNAs are also significantly enriched in the nucleolus. Although this association was never described in plant cells, previous reports showed a nucleolar association of tRNA genes in yeast and human cells (Nemeth et al., 2010; Thompson et al., 2003). Interestingly, the presence of a nearby tRNA gene was shown to antagonize Pol II RNA transcription in yeast, due to its clustering near or in the nucleolus (Wang et al., 2005). This phenomenon is known as tRNA gene-mediated silencing and involves the proteins MOD5 and Condensin (Haeusler et al., 2008; Pratt-Hyatt et al., 2013). However, we show here that several hundred functional genes associate with NADs and only a small portion have a tRNA gene nearby. Other mechanisms to explain tRNA gene nucleolar association may exist. Whether their association with the nucleolus is biologically relevant remains unknown, but because no RNA pol II is present in the nucleolus, NAD-genes may be sequestered there to prevent their expression. This hypothesis is reinforced by the observation that NAD-genes are typically silent or expressed at low levels, but also by the fact that some genes that were NAD-genes in Col-0, but not in *nuc1*, became significantly up-regulated in *nuc1* (Figure 5). These observations reinforce a possible link between gene silencing and nucleolus association.

Regulation by nucleolar sequestration is known to control certain protein functions, especially during stress conditions. In mammalian cells rDNA intergenic transcripts accumulate in the nucleolus after heat shock and provoke the nucleolar sequestration of nuclear proteins like the DNA methyltransferase DNMT1, the proteasome factor SUG1, or POLD1, a key factor of DNA replication (Audas et al., 2012a, 2012b). A similar mechanism may exist to regulate transcription by a phenomenon that could be named transcriptional regulation by nucleolar sequestration.

MATERIEL AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Seeds corresponding to *nuc1-1* and *nuc1-2* plants lines (SALK_053590 and SALK_002764 respectively) were previously reported in (Pontvianne et al., 2007, 2010) and are available through the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Seeds of *nuc2-2* mutant (SALK GABI_178D01) and *nuc2*:NUC2 complemented line were described in (Durut et al., 2014). Third generation of the knockout mutant *fas1-4* (SAIL_662_D10) and *fas2-4* (SALK_033228) are used in figure 7 and were described in (Exner et al., 2006). For FANoS,

wild-type Col-0 expressing the FIB2:YFP fusion protein was described in (Pontvianne et al., 2013). The *nuc1-2* plants were crossed with Col-0 FIB2:YFP to introgress the nucleolar marker in the *nuc1-2* mutant background. All plant material used here were grown in control growth chambers, on soil at 21°C with a day light period of 16h per day.

Nuclear and Nucleolar DNA preparation and sequencing

1 gram of leaves from 3-week-old FIB2:YFP plants are fixed for 20 min in 4% formaldehyde in Tris buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) and are then washed twice for 10 min in ice-cold Tris buffer. Washed leaves are minced with a razor blade in 1 mL of 45 mM MgCl2, 20 mM MOPS (pH 7.0), 30 mM sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. The homogenate is filtered through 30μm mesh (PARTEC CellTrics) and subjected to FACS to sort nuclei or sonicated using a Bioruptor (three 5-min pulses, medium power; Diagenode) to liberate nucleoli that were then sorted by FANoS. Sorting of nuclei or nucleoli was triggered by the FIB2:YFP signal using a BD FACS Aria II. Sorted nuclei or nucleoli were treated with RNase A and proteinase K prior to purification and concentration using the kit ChIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research). DNA libraries were generated via the kit Nextera XT DNA sample preparation (Illumina®) according to manufacturer's instruction, and were then subjected to high throughput paired-end 2X125nt sequencing on a Hiseq 2500 apparatus (Illumina ®). Around 40 million clusters were recovered from the sequencing.

Cytogenetic Analyses

DNA-FISH and or DAPI-stained nuclei analyses were performed using nuclei from leaves of 3 or 4-week-old plants as described previously in (Pontvianne et al., 2012). Telomere-specific probe was generated by PCR on total genomic DNA from Col-0 wild-type with the primer 5Telo (TTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGG) and 3Telo (CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAA) prior to its labeling with digoxigenin-11-UTP (Roche).

Evaluation of telomere lengths using TRF and PETRA analysis

Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kits (Illustra) were used for DNA extraction according to manufacturer´s protocol from 3 week-old rosette leaves. Five hundred ng of genomic DNA were analysed either by terminal restriction fragment analysis (TRF) or by method of primer extension telomere repeat amplification (PETRA). TRF analysis was performed according to (Ruckova et al., 2008) and samples were digested by MseI (NEB). For PETRA method (Vespa et al., 2007) chromosome specific primers for 3L, 4R, 5L and 5R described in (Heacock et al., 2004) were used. Samples from both types of analysis were then separated by 0,8% agarose gel electrophoresis followed by Southern hybridization with [32P]-labelled telomeric probe TR4C (CCCTAAA)4.

Bioinformatic and statistical analyses

For each library, 30-50 .10^6 reads were obtained with 85-90% of the bases displaying a Q-score ≥ 30, with a mean Q-score of 38 as assessed with Fastqc. After, filtering out of reads corresponding to chloroplastic, mitochondrial and rRNA genes was performed with Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012). Remaining reads were mapped against the TAIR 10_genome with bowtie2 in sensitive local mode and no mismatch. TEs were analysed according to the annotation published in (Flutre et al., 2011). Quantification by 10kb windows was made with bedtools software (http://bedtools.readthedocs.org/en/latest/). Regions with foldchange No/N superior to 2 are tagged differentially covered (DC).

Total RNA were extracted from three pools of three week-old Arabidopsis plant leaf tissues of wilt-type Col-0 or *nuc1-2* mutant using TRIzol reagent (MRC, Inc.). Sequencing

was performed by the MGX facility (Montpellier) using a Hiseq 2000 to generate 1X 51bp long reads. Illumina reads from non-stranded, polyA+ RNA deep sequencing libraries were aligned to the *A. thaliana* TAIR10 annotated genome reference using Tophat2, Cufflinks, Cuffmerge and Cuffdiff (Langmead and Salzberg, 2012).

The Z test calcul for 2 Population Proportions was used to whether or not the data differ between wild-type Col-0 and *nuc1* mutant in figures 2A, 4E-F and 6D.

ACCESSION NUMBERS

The NCBI accession number for the DNA-seq and RNA-seq data reported in this paper is SUB1340932 and BioProject ID is PRJNA312431.

COMPETING INTERESTS

The authors (FP, MCC, ND, VP, HP, MR, CSP, JF, and JSV) declare no conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTION

MC performed most bioinformatic analyses. ND and VM realised telomere-shortening analyses of Figure 7. HP and MR realised the deep sequencing. CSP, JF and JSV contributed to the design and/or the interpretation of the data. FP designed, performed and analysed all experiments except figure 7 and wrote the manuscript.

AKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Eric Lasserre for his help in TEs analyses, Pascale Comella for her logistic support, Todd Blevins for correcting English and Marie Mirouze for fruitful discussions. We also thank the flow cytometry facility of Montpellier RIO Imaging. This work was supported by CNRS, ANR JCJC NucleoReg (ANR-15-CE12-0013-01) and by BQR2014 (UPVD) LANoS to FP, ANR SubCellif (SVSE2_SUBCELIF 087217) to JS and GAČR P501/11/0289 to JF. The international collaboration between France and the Czech republic is supported by the Barrande program to JS (35626NL) and JF (7AMB16FR014).

REFERENCES

Allain FH, Bouvet P, Dieckmann T, Feigon J. 2000a. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J* **19**: 6870–6881.

Allain FH, Gilbert DE, Bouvet P, Feigon J. 2000b. Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol* **303**: 227–241.

Angel A, Song J, Dean C, Howard M. 2011. A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature* **476**: 105–108.

Aoyama T, Chua NH. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J Cell Mol Biol* **11**: 605–612.

Armstrong SJ, Franklin FC, Jones GH. 2001. Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in Arabidopsis thaliana. *J Cell Sci* **114**: 4207–4217.

Audas TE, Jacob MD, Lee S. 2012a. Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol Cell* **45**: 147–157.

Audas TE, Jacob MD, Lee S. 2012b. The nucleolar detention pathway: A cellular strategy for regulating molecular networks. *Cell Cycle Georget Tex* **11**: 2059–2062.

Austriaco NRJ, Guarente LP. 1997. Changes of telomere length cause reciprocal changes in the lifespan of mother cells in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9768–9772.

Badrinarayanan A, Le TBK, Laub MT. 2015. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 171–199.

Bantignies F, Roure V, Comet I, Leblanc B, Schuettengruber B, Bonnet J, Tixier V, Mas A, Cavalli G. 2011. Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in Drosophila. *Cell* **144**: 214–226.

Belton J-M, McCord RP, Gibcus JH, Naumova N, Zhan Y, Dekker J. 2012. Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods San Diego Calif* **58**: 268–276.

Benoit M, Layat E, Tourmente S, Probst AV. 2013. Heterochromatin dynamics during developmental transitions in Arabidopsis - a focus on ribosomal DNA loci. *Gene* **526**: 39–45.

Berger AB, Cabal GG, Fabre E, Duong T, Buc H, Nehrbass U, Olivo-Marin J-C, Gadal O, Zimmer C. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods* **5**: 1031–1037.

Berry S, Dean C. 2015. Environmental perception and epigenetic memory: mechanistic insight through FLC. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 133–148.

Berry S, Hartley M, Olsson TSG, Dean C, Howard M. 2015. Local chromatin environment of a Polycomb target gene instructs its own epigenetic inheritance. *eLife* **4**.

Bickmore WA, van Steensel B. 2013. Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* **152**: 1270–1284.

Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S, Vaiman D, Veitia RA. 2010. Heterosis. *Plant Cell* **22**: 2105–2112.

Blevins T, Pontvianne F, Cocklin R, Podicheti R, Chandrasekhara C, Yerneni S, Braun C, Lee B, Rusch D, Mockaitis K, et al. 2014. A two-step process for epigenetic inheritance in Arabidopsis. *Mol Cell* **54**: 30–42.

Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 574–585.

Borghi L. 2010. Inducible gene expression systems for plants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **655**: 65–75.

Boudonck K, Dolan L, Shaw PJ. 1999. The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* **10**: 2297–2307.

Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert F-M, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**: 216–227.

Bourbousse C, Mestiri I, Zabulon G, Bourge M, Formiggini F, Koini MA, Brown SC, Fransz P, Bowler C, Barneche F. 2015. Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E2836–2844.

Bouvet P, Allain FH, Finger LD, Dieckmann T, Feigon J. 2001. Recognition of pre-formed and flexible elements of an RNA stem-loop by nucleolin. *J Mol Biol* **309**: 763–775.

Brangwynne CP, Mitchison TJ, Hyman AA. 2011. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in Xenopus laevis oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4334–4339.
Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y-S, Penfold CA, Jenkins D, et al. 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**: 873–894.
Brennecke P, Anders S, Kim JK, Kolodziejczyk AA, Zhang X, Proserpio V, Baying B, Benes V, Teichmann SA, Marioni JC, et al. 2013. Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods* **10**: 1093–1095.
Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F. 2010. Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* **1800**: 806–814.
BROWN DD, GURDON JB. 1964. ABSENCE OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS IN THE ANUCLEOLATE MUTANT OF XENOPUS LAEVIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 139–146.
Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**: E107–112.
Carneiro T, Carvalho C, Braga J, Rino J, Milligan L, Tollervey D, Carmo-Fonseca M. 2007. Depletion of the yeast nuclear exosome subunit Rrp6 results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. *Mol Cell Biol* **27**: 4157–4165.
Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**: 427–439.
Caudron-Herger M, Pankert T, Seiler J, Nemeth A, Voit R, Grummt I, Rippe K. 2015. Alu element-containing RNAs maintain nucleolar structure and function. *EMBO J* **34**: 2758–2774.
Chandrasekhara C, Mohannath G, Blevins T, Pontvianne F, Pikaard CS. 2016. Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev* **30**: 177–190.
Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G-W, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, et al. 2013. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* **155**: 1479–1491.
Chen M, Galvao RM, Li M, Burger B, Bugea J, Bolado J, Chory J. 2010. Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell* **141**: 1230–1240.
Chen M, Schwab R, Chory J. 2003. Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14493–14498.
Chen ZJ. 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nat Rev Genet* **14**: 471–482.
Chen ZJ. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci* **15**: 57–71.
Cisse II, Izeddin I, Causse SZ, Boudarene L, Senecal A, Muresan L, Dugast-Darzacq C, Hajj B, Dahan M, Darzacq X. 2013. Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science* **341**: 664–667.
Collier S, Pendle A, Boudonck K, van Rij T, Dolan L, Shaw P. 2006. A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **17**: 2942–2951.
Comella P, Pontvianne F, Lahmy S, Vignols F, Barbezier N, Debures A, Jobet E, Brugidou E, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2008. Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **36**: 1163–1175.
Cook PR. 1999. The organization of replication and transcription. *Science* **284**: 1790–1795.
Copenhaver GP, Pikaard CS. 1996. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of Arabidopsis thaliana adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J Cell Mol Biol* **9**: 259–272.
Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe. *Ann Bot* **103**: 1–11.
Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* **295**: 1306–1311.

Deltour R, de Barsy T. 1985. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J Cell Sci* **76**: 67–83.
de Nadal E, Ammerer G, Posas F. 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* **12**: 833–845.
Derenzini M, Thiry M, Goessens G. 1990. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **38**: 1237–1256.
Dieppois G, Stutz F. 2010. Connecting the transcription site to the nuclear pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *J Cell Sci* **123**: 1989–1999.
Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN. 2008. Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* **320**: 942–945.
Dittmer TA, Stacey NJ, Sugimoto-Shirasu K, Richards EJ. 2007. LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **19**: 2793–2803.
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. *Plant Cell* **26**: 1330–1344.
Durut N, Saez-Vasquez J. 2015. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene* **556**: 7–12.
Dvorackova M, Fojtova M, Fajkus J. 2015. Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 18–37.
Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* **24**: 1119–1132.
Efroni I, Ip P-L, Nawy T, Mello A, Birnbaum KD. 2015. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol* **16**: 9.
Exner V, Taranto P, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L. 2006. Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Dev Camb Engl* **133**: 4163–4172.
Falahati H, Pelham-Webb B, Blythe S, Wieschaus E. 2016. Nucleation by rRNA Dictates the Precision of Nucleolus Assembly. *Curr Biol CB* **26**: 277–285.
Falkan S. High resolution autoradiography studies on chromatin functions. *1978* 3–53.
Fang Y, Hearn S, Spector DL. 2004. Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **15**: 2664–2673.
Fang Y, Spector DL. 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol CB* **17**: 818–823.
Feng C-M, Qiu Y, Van Buskirk EK, Yang EJ, Chen M. 2014a. Light-regulated gene repositioning in Arabidopsis. *Nat Commun* **5**: 3027.
Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, et al. 2014b. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 4632–4637.
Ferro M, Brugiere S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, et al. 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics MCP* **9**: 1063–1084.
Filion GJ, van Bemmel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, et al. 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* **143**: 212–224.
Flutre T, Duprat E, Feuillet C, Quesneville H. 2011. Considering transposable element diversification in de novo annotation approaches. *PloS One* **6**: e16526.
Fontana F. 1781. traité sur le venin de la vipère [...] avec des observations sur la structure primitive du corps animale [...].
Fransz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. 2002. Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops

emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14584–14589.
Gall JG. 2003. The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 975–980.
Ganot P, Jady BE, Bortolin ML, Darzacq X, Kiss T. 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol* **19**: 6906–6917.
Gibcus JH, Dekker J. 2013. The hierarchy of the 3D genome. *Mol Cell* **49**: 773–782.
Granneman S, Baserga SJ. 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 281–286.
Graumann K, Evans DE. 2011. Nuclear envelope dynamics during plant cell division suggest common mechanisms between kingdoms. *Biochem J* **435**: 661–667.
Graumann K, Evans DE. 2010. Plant SUN domain proteins: components of putative plant LINC complexes? *Plant Signal Behav* **5**: 154–156.
Grillet L, Mari S, Schmidt W. 2014. Iron in seeds - loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* **4**: 535.
Grob A, Colleran C, McStay B. 2014. Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes Dev* **28**: 220–230.
Grob S, Schmid MW, Luedtke NW, Wicker T, Grossniklaus U. 2013. Characterization of chromosomal architecture in Arabidopsis by chromosome conformation capture. *Genome Biol* **14**: R129.
Grummt I, Langst G. 2013. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 393–404.
Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, et al. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**: 948–951.
Guidi M, Ruault M, Marbouty M, Loiodice I, Cournac A, Billaudeau C, Hocher A, Mozziconacci J, Koszul R, Taddei A. 2015. Spatial reorganization of telomeres in long-lived quiescent cells. *Genome Biol* **16**: 206.
Gu J, Patton JR, Shimba S, Reddy R. 1996. Localization of modified nucleotides in Schizosaccharomyces pombe spliceosomal small nuclear RNAs: modified nucleotides are clustered in functionally important regions. *RNA N Y N* **2**: 909–918.
Hacot S, Coute Y, Belin S, Albaret MA, Mertani HC, Sanchez J-C, Rosa-Calatrava M, Diaz J-J. 2010. Isolation of nucleoli. *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al* **Chapter 3**: Unit3.36.
Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Good PD, Gipson TA, Engelke DR. 2008. Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev* **22**: 2204–2214.
Hallais M, Pontvianne F, Andersen PR, Clerici M, Lener D, Benbahouche NEH, Gostan T, Vandermoere F, Robert M-C, Cusack S, et al. 2013. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1358–1366.
Heacock M, Spangler E, Riha K, Puizina J, Shippen DE. 2004. Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *EMBO J* **23**: 2304–2313.
Heard E, Bickmore W. 2007. The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 311–316.
Heitz E. 1931. Nukleolen und Chromosomen in der Gattung Vicia. *Planta* **15**: 495–505.
Hernandez-Verdun D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucl Austin Tex* **2**: 189–194.
Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J. 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* **115**: 2265–2270.
Hiscox JA. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**: 119–127.
Hiscox JA, Whitehouse A, Matthews DA. 2010. Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* **10**: 4077–4086.
Houseley J, Tollervey D. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**: 763–776.
Hozak P, Novak JT, Smetana K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* **66**: 225–233.

Ide S, Miyazaki T, Maki H, Kobayashi T. 2010. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**: 693–696.
Ito H, Kakutani T. 2014. Control of transposable elements in Arabidopsis thaliana. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* **22**: 217–223.
Jacob MD, Audas TE, Uniacke J, Trinkle-Mulcahy L, Lee S. 2013. Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. *Mol Biol Cell* **24**: 2943–2953.
Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD. 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 763–768.
Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. 2006. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* **17**: 944–954.
Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* **41**: e188.
Johnson FB, Marciniak RA, Guarente L. 1998. Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 332–338.
Kannan K, Nelson ADL, Shippen DE. 2008. Dyskerin is a component of the Arabidopsis telomerase RNP required for telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **28**: 2332–2341.
Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in Drosophila melanogaster. *Nature* **471**: 480–485.
Kim SH, Koroleva OA, Lewandowska D, Pendle AF, Clark GP, Simpson CG, Shaw PJ, Brown JWS. 2009. Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell* **21**: 2045–2057.
Kim SH, Macfarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, Haupt S, Brown JWS, Taliansky M. 2007a. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11115–11120.
Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JWS, Taliansky M. 2007b. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* **26**: 2169–2179.
Kind J, Pagie L, de Vries SS, Nahidiazar L, Dey SS, Bienko M, Zhan Y, Lajoie B, de Graaf CA, Amendola M, et al. 2015. Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell* **163**: 134–147.
Kind J, Pagie L, Ortabozkoyun H, Boyle S, de Vries SS, Janssen H, Amendola M, Nolen LD, Bickmore WA, van Steensel B. 2013. Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* **153**: 178–192.
Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.
Lange H, Holec S, Cognat V, Pieuchot L, Le Ret M, Canaday J, Gagliardi D. 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.
Lange H, Zuber H, Sement FM, Chicher J, Kuhn L, Hammann P, Brunaud V, Berard 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 Genet* **10**: e1004564.
Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357–359.
Lee JH, Lee YS, Jeong SA, Khadka P, Roth J, Chung IK. 2014. Catalytically active telomerase holoenzyme is assembled in the dense fibrillar component of the nucleolus during S phase. *Histochem Cell Biol* **141**: 137–152.
Lermontova I, Schubert V, Bornke F, Macas J, Schubert I. 2007. Arabidopsis CBF5 interacts with the H/ACA snoRNP assembly factor NAF1. *Plant Mol Biol* **65**: 615–626.
Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW-L, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE. 2006. An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with

Cajal bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell* **126**: 93–106.
Li L, Lyu X, Hou C, Takenaka N, Nguyen HQ, Ong C-T, Cubenas-Potts C, Hu M, Lei EP, Bosco G, et al. 2015. Widespread rearrangement of 3D chromatin organization underlies polycomb-mediated stress-induced silencing. *Mol Cell* **58**: 216–231.
Liu Y, Liu Q, Yan Q, Shi L, Fang Y. 2014. Nucleolus-tethering system (NoTS) reveals that assembly of photobodies follows a self-organization model. *Mol Biol Cell* **25**: 1366–1373.
Lopez-Maury L, Marguerat S, Bahler J. 2008. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* **9**: 583–593.
Loss-Morais G, Waterhouse PM, Margis R. 2013. Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biol Direct* **8**: 6.
Luger K, Richmond TJ. 1998. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 33–40.
Mahata B, Sundqvist A, Xirodimas DP. 2012. Recruitment of RPL11 at promoter sites of p53-regulated genes upon nucleolar stress through NEDD8 and in an Mdm2-dependent manner. *Oncogene* **31**: 3060–3071.
Mais C, Wright JE, Prieto J-L, Raggett SL, McStay B. 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* **19**: 50–64.
Mao YS, Zhang B, Spector DL. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet TIG* **27**: 295–306.
Mathieu O, Jasencakova Z, Vaillant I, Gendrel A-V, Colot V, Schubert I, Tourmente S. 2003. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 2929–2939.
Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJM. 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 367–376.
McClintock B. 1934. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. *Zeit Zellforsch Mik Anat* **21**: 294–328.
McStay B, Grummt I. 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 131–157.
Meister P, Taddei A. 2013. Building silent compartments at the nuclear periphery: a recurrent theme. *Curr Opin Genet Dev* **23**: 96–103.
Michniewicz M, Frick EM, Strader LC. 2015. Gateway-compatible tissue-specific vectors for plant transformation. *BMC Res Notes* **8**: 63.
Moore HM, Bai B, Boisvert F-M, Latonen L, Rantanen V, Simpson JC, Pepperkok R, Lamond AI, Laiho M. 2011. Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics MCP* **10**: M111.009241.
Moore I, Samalova M, Kurup S. 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J Cell Mol Biol* **45**: 651–683.
Mosgoeller W. Nucleolar Ultrastructure in Vertebrates. In *In The Nucleolus*, pp. 10–20, Olson M,O,J, New York.
Mozgova I, Mokros P, Fajkus J. 2010. Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 2768–2780.
Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J. 2009. Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18843–18848.
Nemeth A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, Peterfia B, Solovei I, Cremer T, Dopazo J, Langst G. 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet* **6**: e1000889.
Nemeth A, Langst G. 2011. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet TIG* **27**: 149–156.
Ochs R, Lischwe M, O'Leary P, Busch H. 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp Cell Res* **146**: 139–149.
Ochs RL, Lischwe MA, Shen E, Carroll RE, Busch H. 1985. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* **92**: 330–336.
Padeken J, Mendiburo MJ, Chlamydas S, Schwarz H-J, Kremmer E, Heun P. 2013. The

nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol Cell* **50**: 236–249.
Papantonis A, Cook PR. 2013. Transcription factories: genome organization and gene regulation. *Chem Rev* **113**: 8683–8705.
Paredes S, Branco AT, Hartl DL, Maggert KA, Lemos B. 2011. Ribosomal DNA deletions modulate genome-wide gene expression: "rDNA-sensitive" genes and natural variation. *PLoS Genet* **7**: e1001376.
Paredes S, Maggert KA. 2009. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17829–17834.
Parry G. 2014. Components of the Arabidopsis nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth. *J Exp Bot* **65**: 6057–6067.
Pecinka A, Schubert V, Meister A, Kreth G, Klatte M, Lysak MA, Fuchs J, Schubert I. 2004. Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of Arabidopsis thaliana are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
Pederson T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
Pendle AF, Clark GP, Boon R, Lewandowska D, Lam YW, Andersen J, Mann M, Lamond AI, Brown JWS, Shaw PJ. 2005. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol Biol Cell* **16**: 260–269.
Phizicky EM, Hopper AK. 2010. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev* **24**: 1832–1860.
Pikaard CS, Mittelsten Scheid O. 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a019315.
Pollex T, Heard E. 2012. Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Curr Opin Cell Biol* **24**: 825–832.
Pombo A, Dillon N. 2015. Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 245–257.
Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen SE, Pikaard CS. 2006. The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* **126**: 79–92.
Pontes O, Pikaard CS. 2008. siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 197–203.
Pontes O, Vitins A, Ream TS, Hong E, Pikaard CS, Costa-Nunes P. 2013. Intersection of small RNA pathways in Arabidopsis thaliana sub-nuclear domains. *PloS One* **8**: e65652.
Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ, et al. 2010a. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **6**: e1001225.
Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD, Pikaard CS. 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev* **26**: 945–957.
Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Mozgova I, Hassel C, Pontes OMF, Tucker S, Mokros P, Muchova V, Fajkus J, et al. 2013. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev* **27**: 1545–1550.
Pontvianne F, Blevins T, Pikaard CS. 2010b. Arabidopsis Histone Lysine Methyltransferases. *Adv Bot Res* **53**: 1–22.
Pontvianne F, Matia I, Douet J, Tourmente S, Medina FJ, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2007. Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **18**: 369–379.
Pratt-Hyatt M, Pai DA, Haeusler RA, Wozniak GG, Good PD, Miller EL, McLeod IX, Yates JR 3rd, Hopper AK, Engelke DR. 2013. Mod5 protein binds to tRNA gene complexes and affects local transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E3081–3089.
Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrence RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JC, Baulcombe DC, Viegas W, et al. 2008. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* **32**: 673–684.
Preuss S, Pikaard CS. 2007. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a

chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta* **1769**: 383–392.
Prieto J-L, McStay B. 2007. Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev* **21**: 2041–2054.
Quintana C, Bellefqih S, Laval JY, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Avila J, Ferrer I, Arranz R, Patino C. 2006. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J Struct Biol* **153**: 42–54.
Rajamaki M-L, Valkonen JPT. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in Nicotiana species. *Plant Cell* **21**: 2485–2502.
Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* **255**: 177–235.
Risueno MC, Medina FJ. 1986. The nucleolar structure in plant cells. *Revis Sobre Biol Cel RBC* **7**: 1–154.
RITOSSA FM, SPIEGELMAN S. 1965. LOCALIZATION OF DNA COMPLEMENTARY TO RIBOSOMAL RNA IN THE NUCLEOLUS ORGANIZER REGION OF DROSOPHILA MELANOGASTER. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**: 737–745.
Rosa S, De Lucia F, Mylne JS, Zhu D, Ohmido N, Pendle A, Kato N, Shaw P, Dean C. 2013. Physical clustering of FLC alleles during Polycomb-mediated epigenetic silencing in vernalization. *Genes Dev* **27**: 1845–1850.
Roschzttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S. 2009. Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol* **151**: 1329–1338.
Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure M-P, Conejero G, Ortega R, Curie C, Mari S. 2011. Plant cell nucleolus as a hot spot for iron. *J Biol Chem* **286**: 27863–27866.
Roudier F, Ahmed I, Berard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, et al. 2011. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J* **30**: 1928–1938.
Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N, Eaton ML, Landolin JM, Bristow CA, Ma L, Lin MF, et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. *Science* **330**: 1787–1797.
Ruckova E, Friml J, Prochazkova Schrumpfova P, Fajkus J. 2008. Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Mol Biol* **66**: 637–646.
Saad H, Gallardo F, Dalvai M, Tanguy-le-Gac N, Lane D, Bystricky K. 2014. DNA dynamics during early double-strand break processing revealed by non-intrusive imaging of living cells. *PLoS Genet* **10**: e1004187.
Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M. 2004. A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol* **24**: 7284–7297.
Sakamoto K, Nagatani A. 1996. Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J Cell Mol Biol* **10**: 859–868.
Samaha H, Delorme V, Pontvianne F, Cooke R, Delalande F, Van Dorsselaer A, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2010. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a Brassica oleracea RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant J Cell Mol Biol* **61**: 383–398.
Sanford JR, Caceres JF. 2004. Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *J Cell Sci* **117**: 6261–6263.
Schena M, Lloyd AM, Davis RW. 1991. A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10421–10425.
Schneider C, Tollervey D. 2013. Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* **38**: 485–493.
Schroder JM. 2005. Ferritinopathy: diagnosis by muscle or nerve biopsy, with a note on other nuclear inclusion body diseases. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**: 109–114.
Schrumpfova PP, Vychodilova I, Dvorackova M, Majerska J, Dokladal L, Schorova S, Fajkus J. 2014. Telomere repeat binding proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase. *Plant J Cell Mol Biol* **77**: 770–781.
Schubert V, Berr A, Meister A. 2012. Interphase chromatin organisation in Arabidopsis nuclei:

constraints versus randomness. *Chromosoma* **121**: 369–387.
Schubert V, Weisshart K. 2015. Abundance and distribution of RNA polymerase II in Arabidopsis interphase nuclei. *J Exp Bot* **66**: 1687–1698.
Schuler M, Bauer P. 2011. Heavy Metals Need Assistance: The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the Arabidopsis NAS Gene Family. *Front Plant Sci* **2**: 69.
Scott MS, Boisvert F-M, Lamond AI, Barton GJ. 2011. PNAC: a protein nucleolar association classifier. *BMC Genomics* **12**: 74.
Sequeira-Mendes J, Araguez I, Peiro R, Mendez-Giraldez R, Zhang X, Jacobsen SE, Bastolla U, Gutierrez C. 2014. The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* **26**: 2351–2366.
Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2015. Genome architecture: from linear organisation of chromatin to the 3D assembly in the nucleus. *Chromosoma*.
Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies F, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. 2012. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* **148**: 458–472.
Shaw PJ, Jordan EG. 1995. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 93–121.
Sikorski PJ, Zuber H, Philippe L, Sement FM, Canaday J, Kufel J, Gagliardi D, Lange H. 2015. Distinct 18S rRNA precursors are targets of the exosome complex, the exoribonuclease RRP6L2 and the terminal nucleotidyltransferase TRL in Arabidopsis thaliana. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 991–1004.
Sleeman JE, Ajuh P, Lamond AI. 2001. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci* **114**: 4407–4419.
Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 555–590.
Spector DL, Lamond AI. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6**: 782–792.
Stavreva DA, Kawasaki M, Dundr M, Koberna K, Muller WG, Tsujimura-Takahashi T, Komatsu W, Hayano T, Isobe T, Raska I, et al. 2006. Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* **26**: 5131–5145.
Stepinski D. 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* **251**: 1285–1306.
Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE. 2013. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* **152**: 352–364.
Sullivan AM, Arsovski AA, Lempe J, Bubb KL, Weirauch MT, Sabo PJ, Sandstrom R, Thurman RE, Neph S, Reynolds AP, et al. 2014. Mapping and dynamics of regulatory DNA and transcription factor networks in A. thaliana. *Cell Rep* **8**: 2015–2030.
Taddei A, Van Houwe G, Hediger F, Kalck V, Cubizolles F, Schober H, Gasser SM. 2006. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* **441**: 774–778.
Taliansky ME, Brown JWS, Rajamaki ML, Valkonen JPT, Kalinina NO. 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* **77**: 119–158.
Tamura K, Fukao Y, Iwamoto M, Haraguchi T, Hara-Nishimura I. 2010. Identification and characterization of nuclear pore complex components in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 4084–4097.
Tatout C, Evans DE, Vanrobays E, Probst AV, Graumann K. 2014. The plant LINC complex at the nuclear envelope. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* **22**: 241–252.
ten Hove CA, Lu K-J, Weijers D. 2015. Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Dev Camb Engl* **142**: 420–430.
Tessadori F, Schulkes RK, van Driel R, Fransz P. 2007. Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J Cell Mol Biol* **50**: 848–857.

Tessadori F, van Zanten M, Pavlova P, Clifton R, Pontvianne F, Snoek LB, Millenaar FF, Schulkes RK, van Driel R, Voesenek LACJ, et al. 2009. Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **5**: e1000638.
Thiry M, Lafontaine DLJ. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* **15**: 194–199.
Thompson M, Haeusler RA, Good PD, Engelke DR. 2003. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**: 1399–1401.
Tomecki R, Dziembowski A. 2010. Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism. *RNA N Y N* **16**: 1692–1724.
Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. 2006. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* **17**: 955–965.
Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 351–356.
Van Buskirk EK, Decker PV, Chen M. 2012. Photobodies in light signaling. *Plant Physiol* **158**: 52–60.
van Koningsbruggen S, Gierlinski M, Schofield P, Martin D, Barton GJ, Ariyurek Y, den Dunnen JT, Lamond AI. 2010. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell* **21**: 3735–3748.
van Zanten M, Koini MA, Geyer R, Liu Y, Brambilla V, Bartels D, Koornneef M, Fransz P, Soppe WJJ. 2011. Seed maturation in Arabidopsis thaliana is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 20219–20224.
van Zanten M, Tessadori F, Peeters AJM, Fransz P. 2012. Shedding light on large-scale chromatin reorganization in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **5**: 583–590.
Vespa L, Warrington RT, Mokros P, Siroky J, Shippen DE. 2007. ATM regulates the length of individual telomere tracts in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18145–18150.
Wachtler F, Ellinger A, Schwarzacher HG. 1980. Nucleolar changes in human phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Cell Tissue Res* **213**: 351–360.
Wachtler F, Roubicek C, Schedle A, Mosgoller W, Bretis G, Schwarzacher HG. 1990. Nucleolus organizer regions in human lymphocytes as studied with premature chromosome condensation. *Hum Genet* **84**: 244–248.
Wang C, Liu C, Roqueiro D, Grimm D, Schwab R, Becker C, Lanz C, Weigel D. 2015. Genome-wide analysis of local chromatin packing in Arabidopsis thaliana. *Genome Res* **25**: 246–256.
Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, et al. 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids. *Genetics* **172**: 507–517.
Wang L, Haeusler RA, Good PD, Thompson M, Nagar S, Engelke DR. 2005. Silencing near tRNA genes requires nucleolar localization. *J Biol Chem* **280**: 8637–8639.
Wang L, Ren X, Xing J, Zheng AC. 2010. The nucleolus and viral infection. *Virol Sin* **25**: 151–157.
Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Peng W, Zhang MQ, et al. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**: 897–903.
Warner JR, Soeiro R. 1967. Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 1984–1990.
Watkins NJ, Bohnsack MT. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**: 397–414.
Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A. 1999. Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol* **145**: 437–445.
Zachova D, Fojtova M, Dvorackova M, Mozgova I, Lermontova I, Peska V, Schubert I, Fajkus J, Sykorova E. 2013. Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in Arabidopsis. *Physiol Plant* **149**: 114–126.
Zhao ZW, Roy R, Gebhardt JCM, Suter DM, Chapman AR, Xie XS. 2014. Spatial organization of RNA polymerase II inside a mammalian cell nucleus revealed by reflected light-sheet

superresolution microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 681–686.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Identification of nucleolus-associated chromatin domains (NADs) in *A. thaliana*

A. One z-stack of a DAPI-stained (blue) nucleus from an *A. thaliana* leaf expressing the Fib2:YFP (green) marker. The white line segment indicates positions traversing the nucleus where DAPI signal intensity was plotted as a function of distance along the segment (profile below). Scale bar is 5 μm. B. Confocal images of two FACS-isolated nucleoli where DNA is stained by DAPI (blue), the Fib2:YFP marker delimits the nucleolus (green) and rRNA genes are detected by DNA-FISH (rDNA, red). Scale bar is 2 μm. C. Cartoon depicting the strategy used to isolate and sequence total nuclear (N) and specifically nucleolar (No) DNA in order to identify NADs by deep sequencing. D. Bar plot displaying the proportion of different types of sequence in NADs (below) relative to the entire genome (above). E. Chromosome plots displaying the relative enrichment of a given genomic segment in the nucleolus of wild-type Col-0. The y-axis displays the fold change ratio No/N. Each dot represents a 100kb window. Nucleolus-enriched genomic regions above the threshold (red-dotted line) are coloured in red.

Figure 2: Epigenetic characteristics of NADs

A. Histogram representing the relative enrichment of each chromatin state in NADs compared to the entire reference genome. B. Box plot representing the relative expression of genes present in each category of chromatin state. C. Histogram displaying the relative proportions of each TE superfamily in NADs. The red-dotted line represents the 1X expected enrichment. D. Distribution of all TEs (blue) and NAD-TEs (violet) along all 5 chromosomes.

Figure 3: Description of NAD-genes

A. Distribution of all genes and NAD-genes along all 5 chromosomes. B. Histogram displaying the relative enrichment of NAD-genes in each cluster of orthologous groups (COGs), among pseudogenes and tRNA-genes. The dotted line represents the 1X expected enrichment. C. Dot-plot revealing the relative expression of all genes or NAD-genes in 3 week-old leaves. D. Histogram displaying the relative enrichment of each class of tRNA genes in NADs.

Figure 4: Identification of NADs in *nuc1* mutant

A. PCR detection of rRNA gene variant types in DNA of purified nuclei (N) or nucleoli (No) of wild-type (Col-0) or *nuc1* plants. B. Radar-type diagram displaying the global distribution of NADs in the WT Col-0 (black) and in the *nuc1* mutant (grey) along all five chromosomes. C. Chromosome plots displaying the relative enrichment of genomic sequence as 100kb windows in the nucleolus on each 5 chromosomes in *nuc1* mutant. D. DAPI-stained nuclei from WT Col-0 (left panel) or from *nuc1* plants (right panel). Scale bar is 5μm. E. Box-plot showing the relative proportion of nucleolus-associated centromeres in WT Col-0 or in *nuc1* mutant. F. Box-plot displaying the relative number of heterochromatic signals inside the nucleolus in WT Col-0 or in *nuc1* mutant.

Figure 5: Comparison of NAD-genes in wild-type versus *nuc1* mutant

A. Distribution of all genes, NAD-TEs (red) and NAD-genes (blue) in *nuc1* mutant along all 5 chromosomes. B. Venn diagram showing the relation between NAD-genes from wild-type Col-0 and the *nuc1* mutant, as well as the genes up-regulated in *nuc1* mutant. C. Venn diagram displaying common features between NAD-genes highly associating with the nucleolus in wild-type versus *nuc1* mutant. D-F. Genome browser screenshot showing three

examples of NAD-genes in Col-0 whom nucleolus association is lost in *nuc1* and is accompanied by a significant increase of their expression.

Figure 6: Telomere nucleolar clustering is affected in *nuc1* mutant
A. Chromosome-plot displaying the relative enrichment of genomic sequence as 100kb windows in the nucleolus on each 5 chromosomes of *nuc1* mutant versus WT Col-0. B-C. DNA-FISH analyses using a telomere specific probe (red signal) on DAPI-stained nuclei (Blue) from WT Col-0 (B) or from *nuc1* plants (C). D. Box-plot showing the proportion of nucleolus-associated telomeres in WT Col-0 and in *nuc1* mutant.

Figure 7: *NUC1* disruption induces telomeres shortening
A. TRF analyses of telomere length in 2 WT Col-0 replicates, 2 *nuc1* mutant alleles, *nuc2-2* or complemented *nuc2* mutant, as well as in *fas1-4* and *fas2-4* mutant. B-E. PETRA analyses of telomere length in 2 *nuc1* mutant alleles, 2 replicates of WT Col-0, as well as in *fas1-4* and *fas2-4* mutants. Chromosome specific probes were used to detect the telomere of the left arm of chromosome 3 (B), the right arm of chromosome 4 (C), as well as the left (D) or right (E) arm of chromosome 5.

Supplemental figure 1: NAD-genes and TEs reactivation in *nuc1* mutant.
A-B. Genome browser screenshot showing examples of NAD-genes in Col-0 whom nucleolus association is lost in *nuc1* and is accompanied by a significant increase of their expression. Specific regions are zoom in to allow a better visual analyses of the data. RNA deep sequencing in triplicates (dark blue) and NAD position (light blue) correspond to Col-0 data, while RNA deep sequencing in triplicates (red) and NAD position (orange) correspond to *nuc1* data.

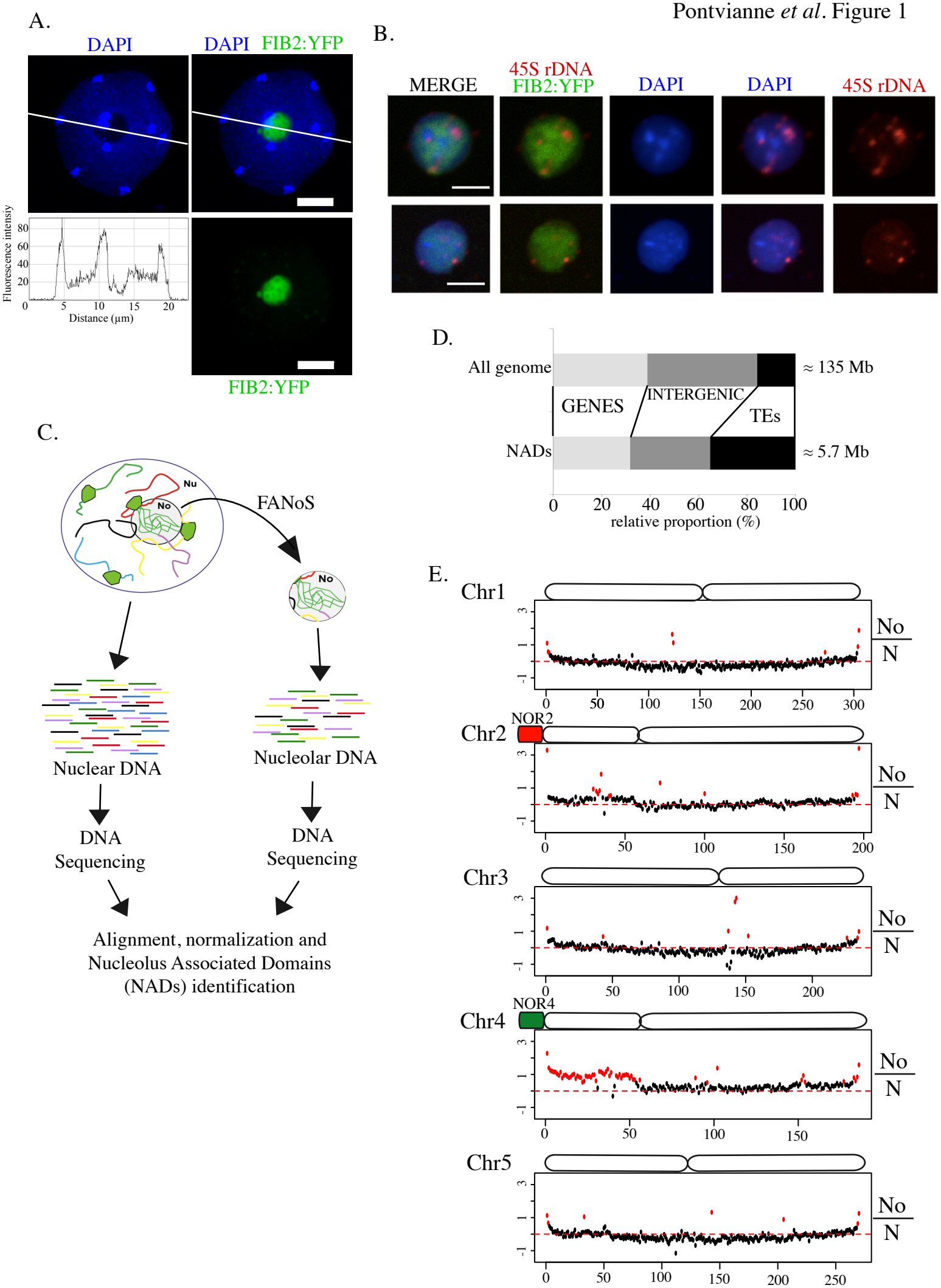
Supplemental table 1: NAD-TEs in Col-0
List of NAD-TEs identified in the Wild-type Col-0 with their fold-change No/N ratio and the associated *p* value.

Supplemental table 2 : NAD-genes in Col-0
List of NAD-genes identified in the Wild-type Col-0 with their fold-change No/N ratio and the associated *p* value.

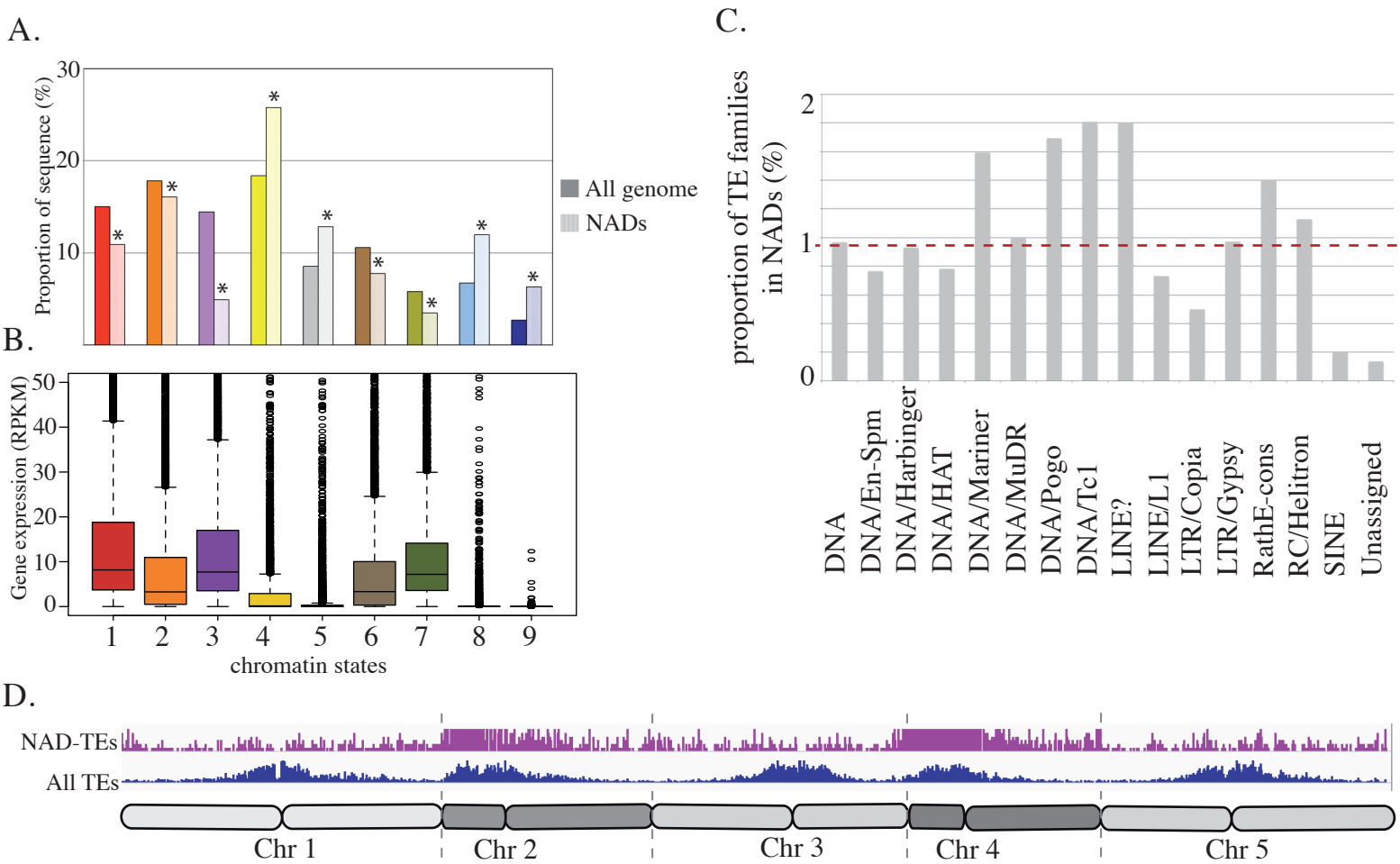
Supplemental table 3 : NAD-TEs in *nuc1*
List of NAD-TEs identified in the mutant *nuc1* with their fold-change No/N ratio and the associated *p* value.

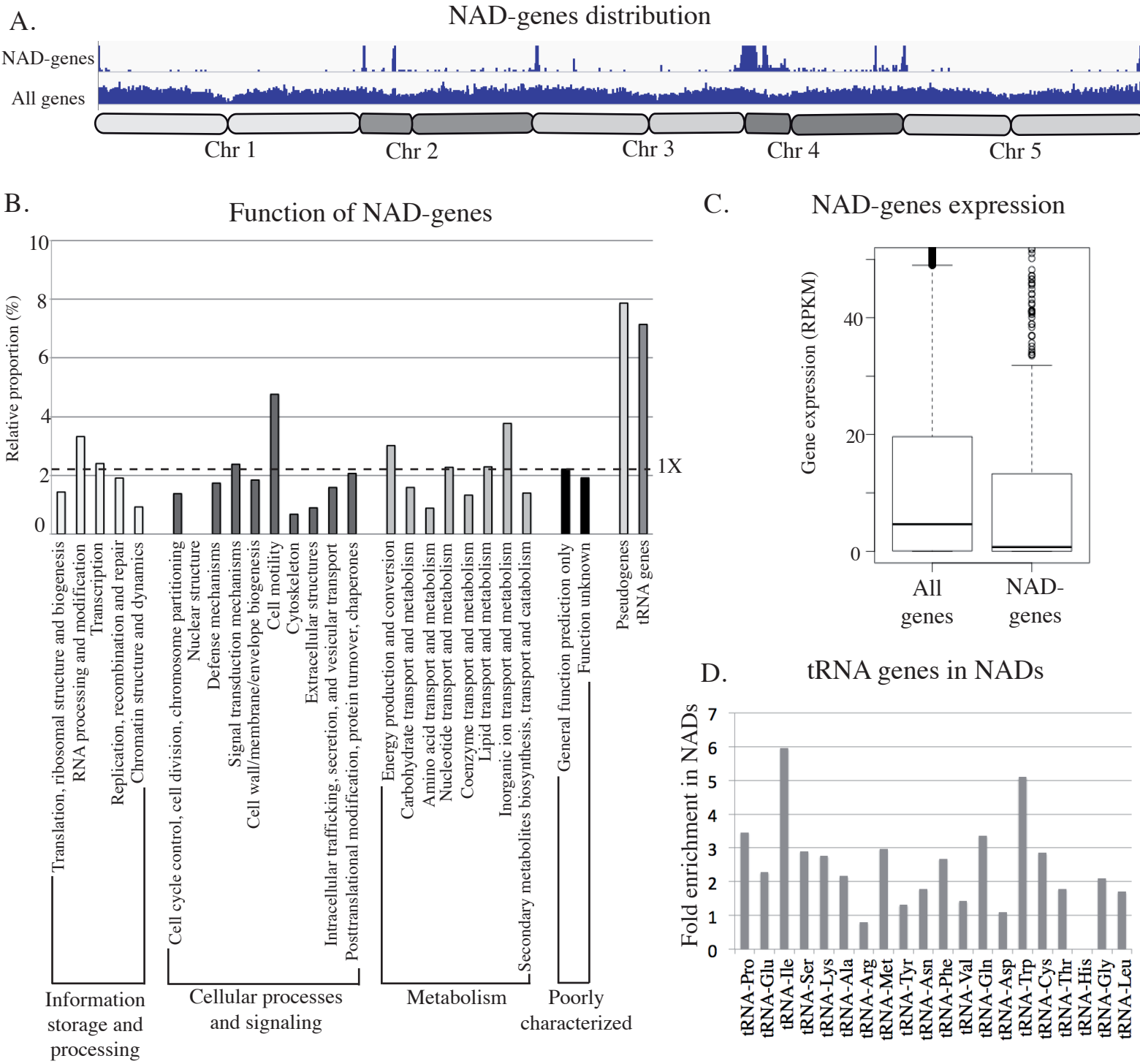
Supplemental table 4 : NAD-genes in *nuc1*
List of NAD-genes identified in the mutant *nuc1* with their fold-change No/N ratio and the associated *p* value.

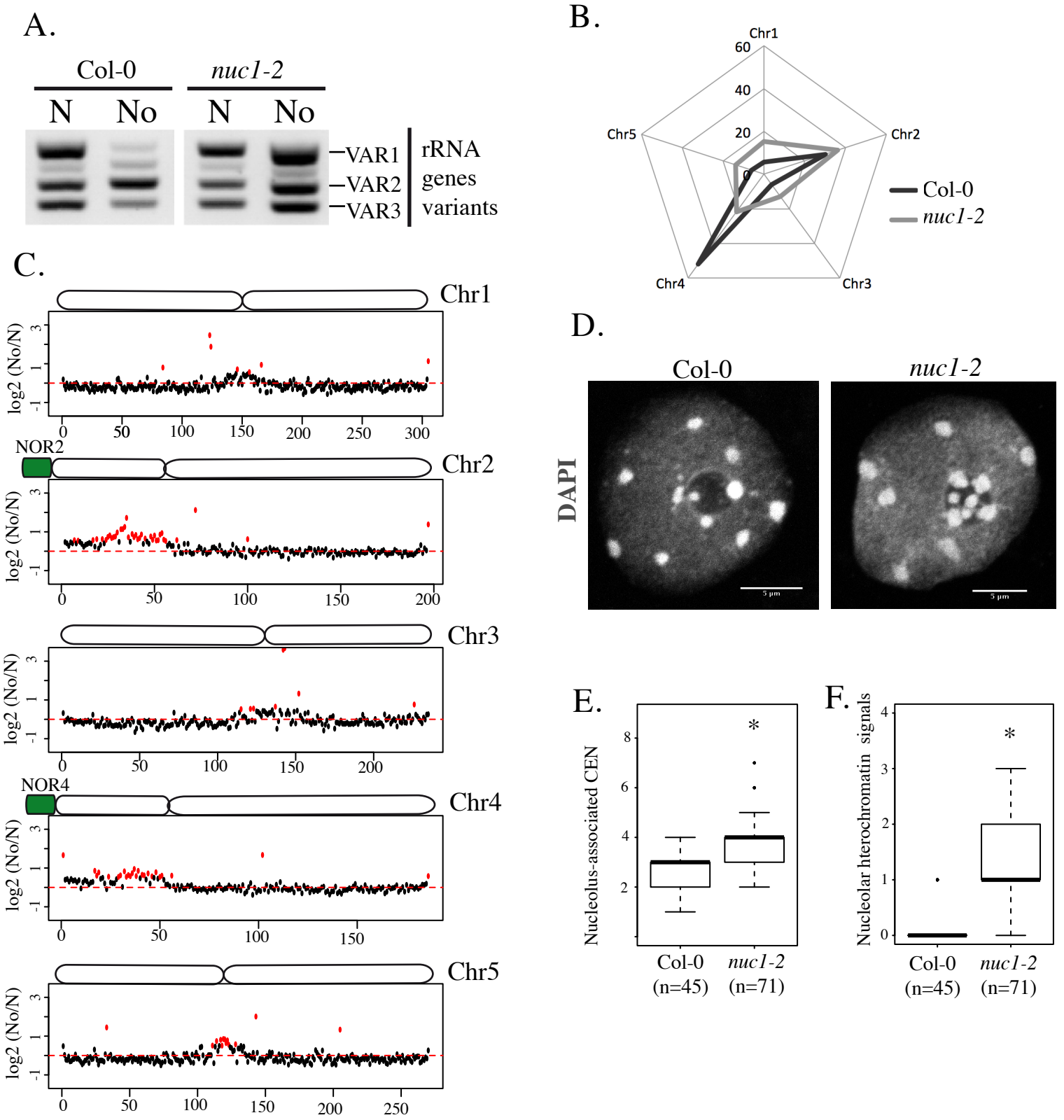
Pontvianne *et al*. Figure 1

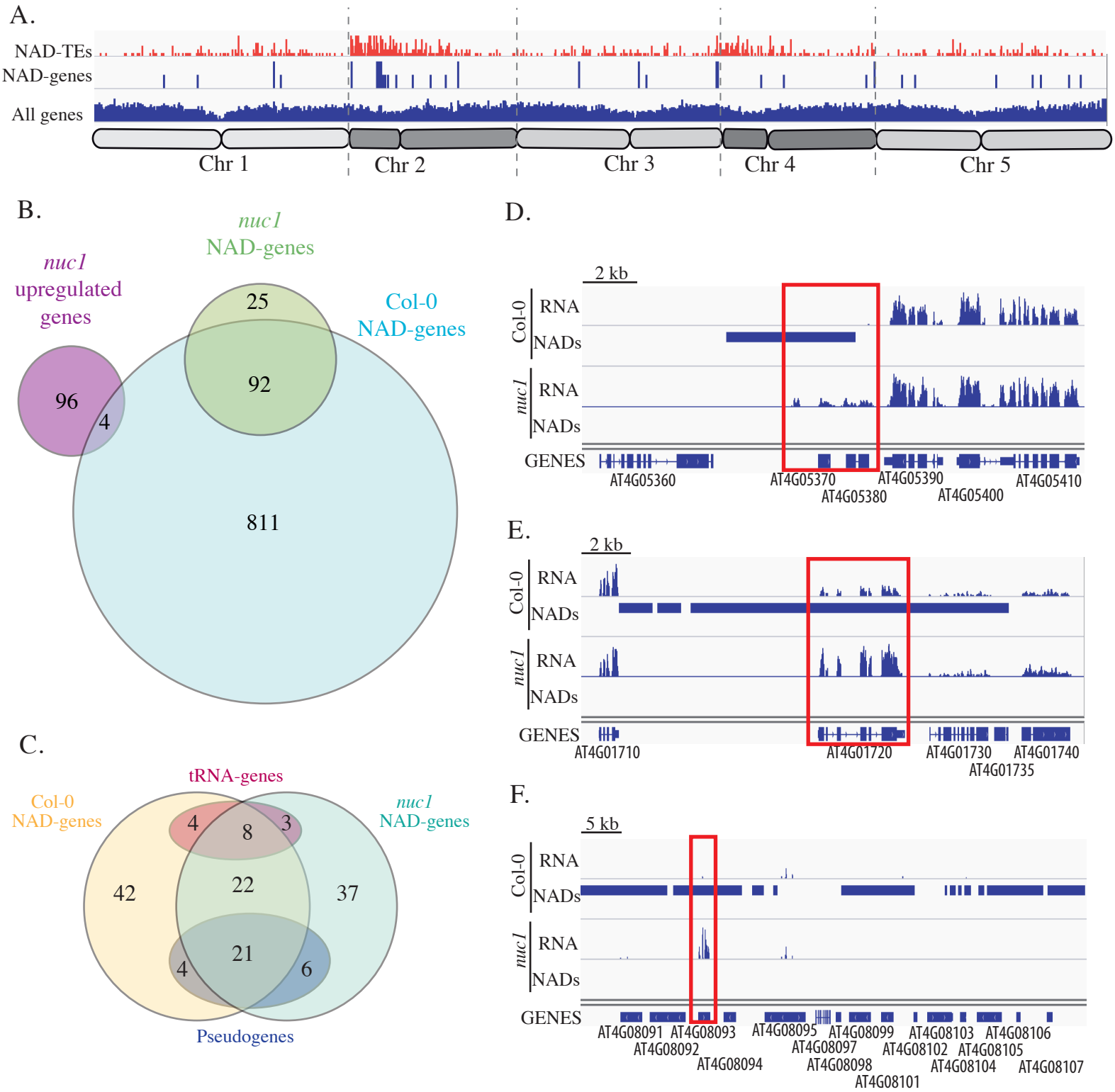


Pontvianne *et al*. Figure 2

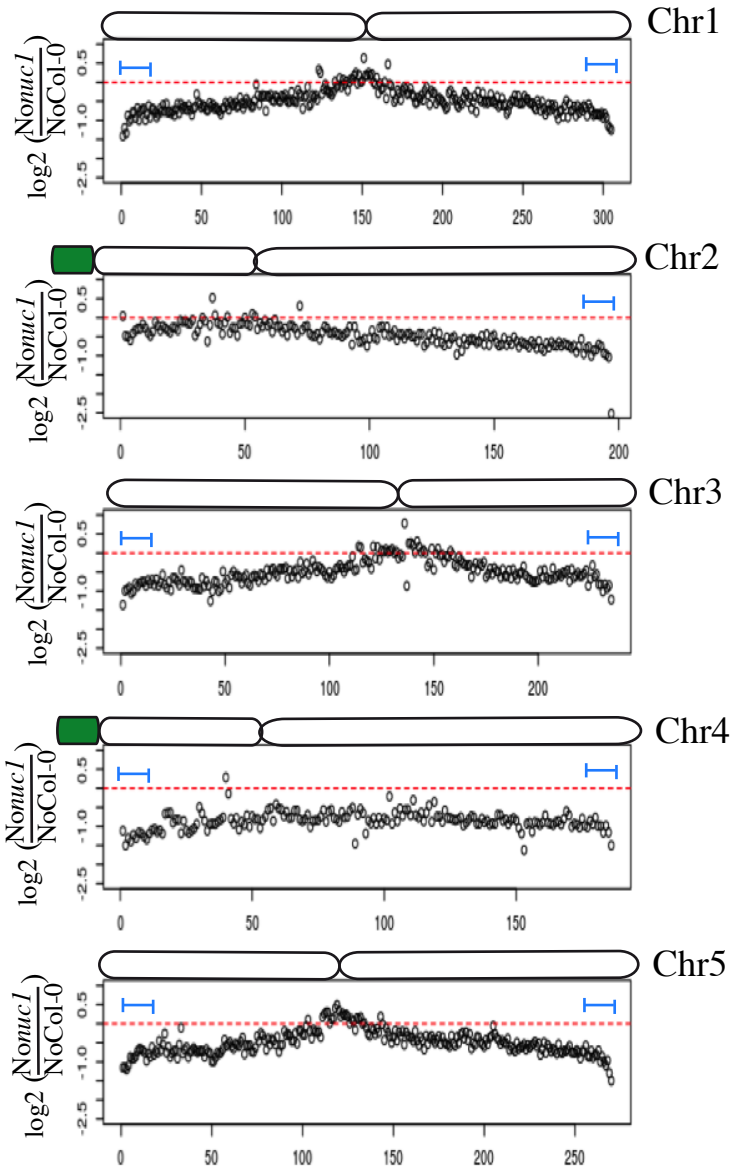



A.
NAD-genes distribution
NAD-genes
All genes
Chr 1
Chr 2
Chr 3
Chr 4
Chr 5
B.
Function of NAD-genes
Relative proportion (%)
10
8
6
4
2
0
1X
Translation, ribosomal structure and biogenesis
RNA processing and modification
Transcription
Replication, recombination and repair
Chromatin structure and dynamics
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
Nuclear structure
Defense mechanisms
Signal transduction mechanisms
Cell wall/membrane/envelope biogenesis
Cell motility
Cytoskeleton
Extracellular structures
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Energy production and conversion
Carbohydrate transport and metabolism
Amino acid transport and metabolism
Nucleotide transport and metabolism
Coenzyme transport and metabolism
Lipid transport and metabolism
Inorganic ion transport and metabolism
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
General function prediction only
Function unknown
Pseudogenes
tRNA genes
Information storage and processing
Cellular processes and signaling
Metabolism
Poorly characterized
C.
NAD-genes expression
Gene expression (RPKM)
40
20
0
All genes
NAD-genes
D.
tRNA genes in NADs
Fold enrichment in NADs
7
6
5
4
3
2
1
0
tRNA-Pro
tRNA-Glu
tRNA-Ile
tRNA-Ser
tRNA-Lys
tRNA-Ala
tRNA-Arg
tRNA-Met
tRNA-Tyr
tRNA-Asn
tRNA-Phe
tRNA-Val
tRNA-Gln
tRNA-Asp
tRNA-Trp
tRNA-Cys
tRNA-Thr
tRNA-His
tRNA-Gly
tRNA-Leu

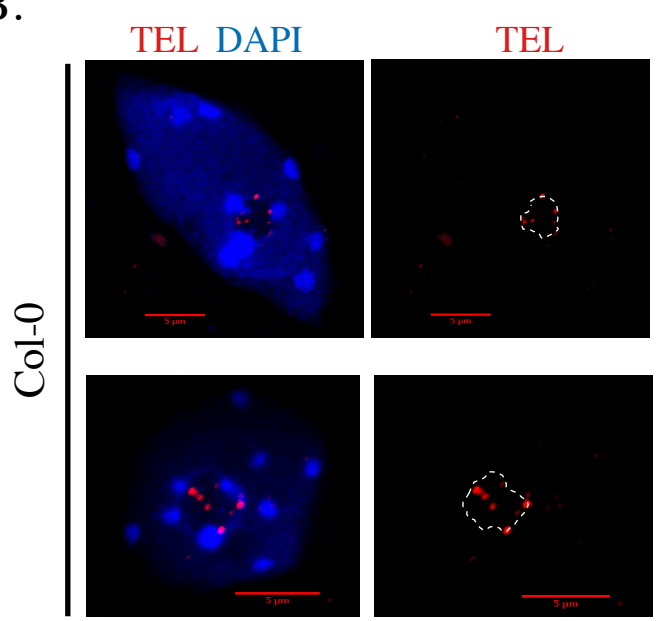

A.
Col-0
nuc1-2
N
No
N
No
VAR1
VAR2
VAR3
rRNA genes variants
B.
Chr1
Chr2
Chr3
Chr4
Chr5
60
40
20
0
Col-0
nuc1-2
C.
Chr1
Chr2
Chr3
Chr4
Chr5
NOR2
NOR4
log2 (No/N)
D.
Col-0
nuc1-2
DAPI
5 µm
E.
Nucleolus-associated CEN
Col-0 (n=45)
nuc1-2 (n=71)
F.
Nucleolar hterochromatin signals
Col-0 (n=45)
nuc1-2 (n=71)


A.
NAD-TEs
NAD-genes
All genes
Chr 1
Chr 2
Chr 3
Chr 4
Chr 5
B.
nuc1 upregulated genes
nuc1 NAD-genes
Col-0 NAD-genes
96
4
25
92
811
C.
tRNA-genes
Col-0 NAD-genes
nuc1 NAD-genes
Pseudogenes
4
8
3
42
22
37
21
4
6
D.
2 kb
Col-0
RNA
NADs
nuc1
RNA
NADs
GENES
AT4G05360
AT4G05370
AT4G05380
AT4G05390
AT4G05400
AT4G05410
E.
2 kb
Col-0
RNA
NADs
nuc1
RNA
NADs
GENES
AT4G01710
AT4G01720
AT4G01730
AT4G01735
AT4G01740
F.
5 kb
Col-0
RNA
NADs
nuc1
RNA
NADs
GENES
AT4G08091
AT4G08092
AT4G08093
AT4G08094
AT4G08095
AT4G08097
AT4G08098
AT4G08099
AT4G08101
AT4G08102
AT4G08103
AT4G08104
AT4G08105
AT4G08106
AT4G08107

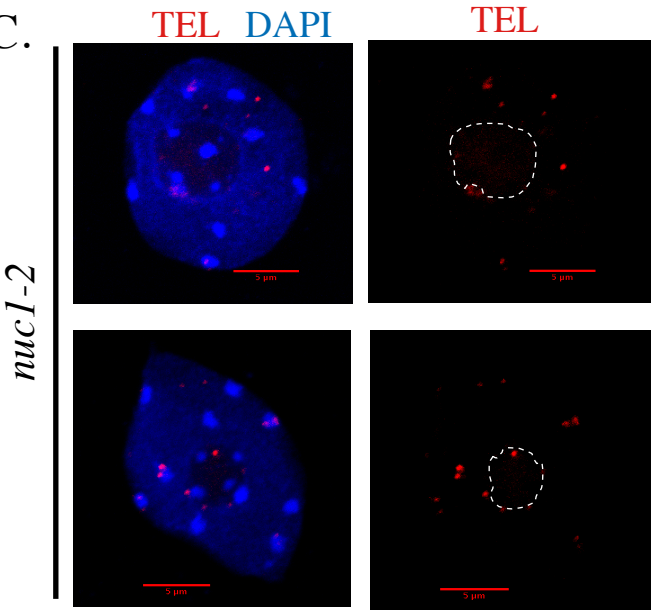
A.


Chr1
Chr2
Chr3
Chr4
Chr5
log2 (Nonuc1 / NoCol-0)

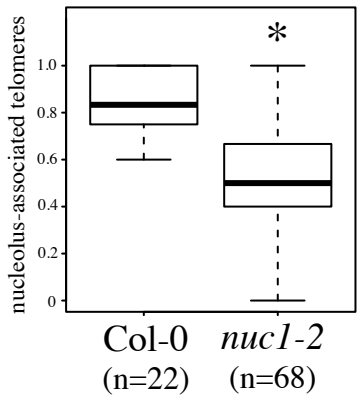
B.

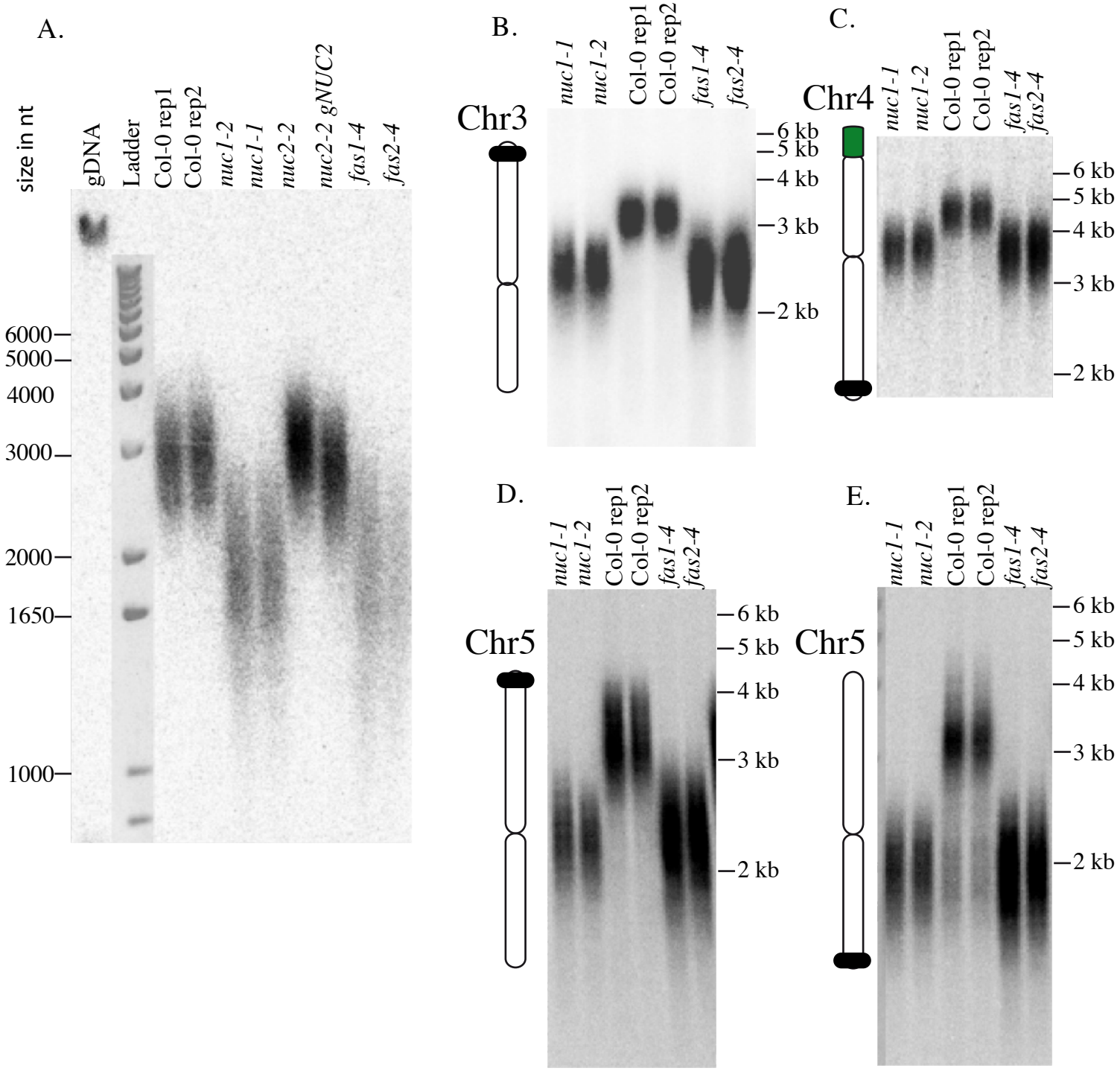

TEL DAPI
TEL
Col-0

C.

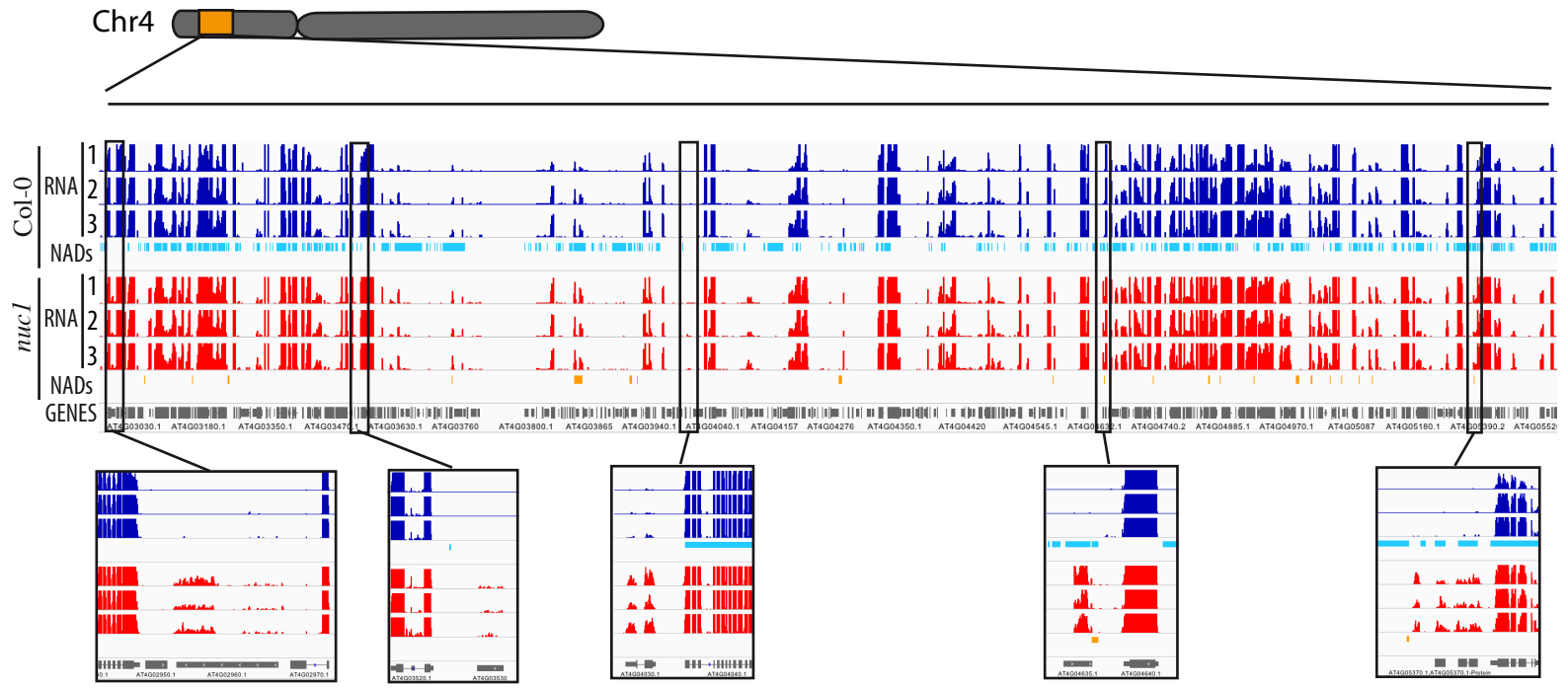

TEL DAPI
TEL
nuc1-2

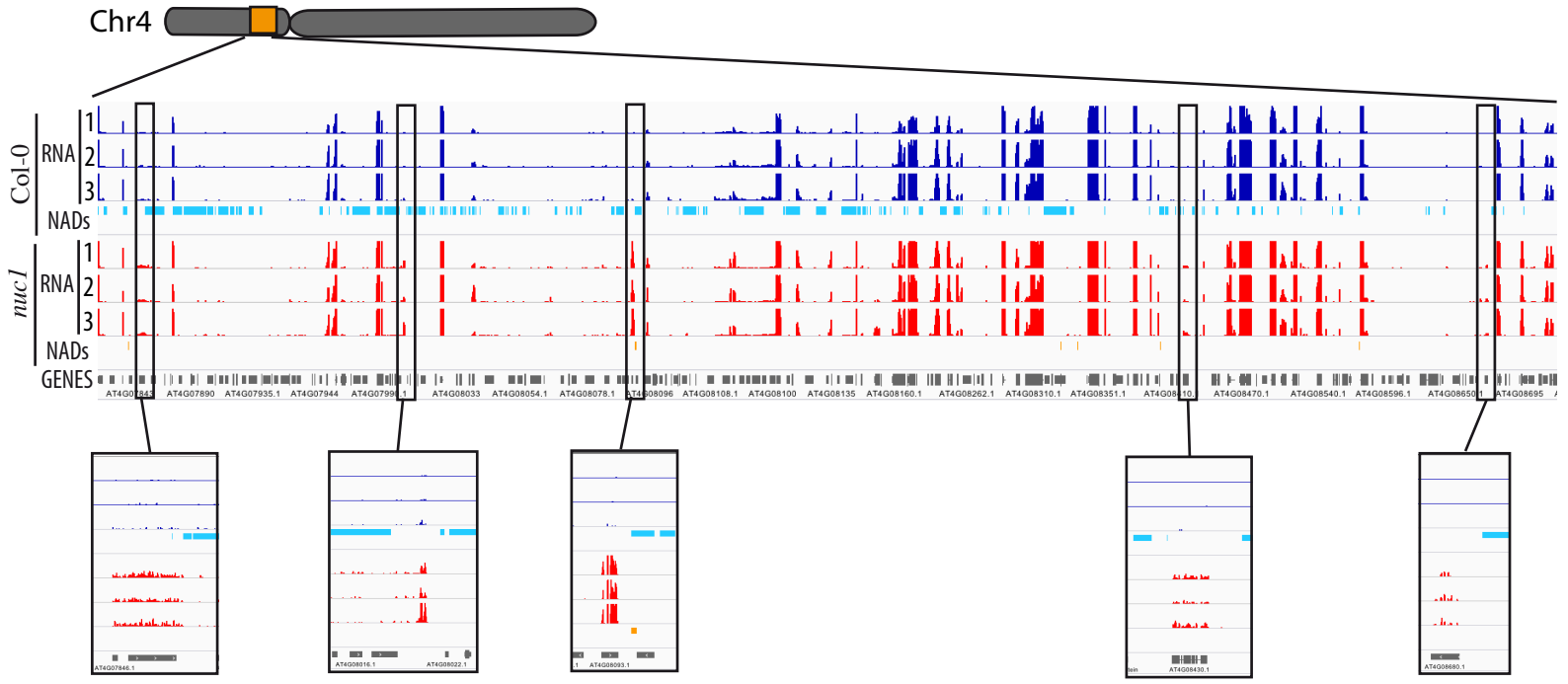
D.


nucleolus-associated telomeres
*
Col-0
(n=22)
nuc1-2
(n=68)


A.
size in nt
gDNA
Ladder
Col-0 rep1
Col-0 rep2
nuc1-2
nuc1-1
nuc2-2
nuc2-2 gNUC2
fas1-4
fas2-4
6000
5000
4000
3000
2000
1650
1000
B.
Chr3
nuc1-1
nuc1-2
Col-0 rep1
Col-0 rep2
fas1-4
fas2-4
6 kb
5 kb
4 kb
3 kb
2 kb
C.
Chr4
nuc1-1
nuc1-2
Col-0 rep1
Col-0 rep2
fas1-4
fas2-4
6 kb
5 kb
4 kb
3 kb
2 kb
D.
Chr5
nuc1-1
nuc1-2
Col-0 rep1
Col-0 rep2
fas1-4
fas2-4
6 kb
5 kb
4 kb
3 kb
2 kb
E.
Chr5
nuc1-1
nuc1-2
Col-0 rep1
Col-0 rep2
fas1-4
fas2-4
6 kb
5 kb
4 kb
3 kb
2 kb

Pontvianne *et al*. Supplemental Figure 1





B. Perspectives du projet NADs :

Depuis le 1ier janvier 2016, le projet lié à la compréhension du rôle dans l'architecture nucléaire et l'expression des gènes est financé par une « ANR jeune chercheur » (NucleoReg, ANR-15-CE12-0013-01). Dans cette section, je développerai les moyens utilisés durant les prochaines années pour approfondir nos connaissances dans ce domaine.

Je propose ici d'étudier le rôle du nucléole dans la régulation transcriptionnelle de gènes transcrits par l'ARN pol II par un mécanisme de séquestration nucléolaire. Cette régulation sera particulièrement analysée lors du développement de la plante, ou en réponse à des variations de conditions environnementales.

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans cette nouvelle voie de régulation, je développerai deux approches complémentaires :

1. La cartographie des domaines associés au nucléole (NADs) à l'échelle d'une population de cellules / tissus / organisme dans des conditions standards ou particulières de croissance
2. Le développement de méthodes de visualisation en temps réel de gènes « simple copie »

Arabidopsis thaliana est un très bon modèle pour étudier la fonction nucléolaire chez les eucaryotes. A la différence des cellules de mammifères ou de levures, le nucléole est organisé comme un corps rond, généralement situé au centre du noyau. Ceci est particulièrement important car un nucléole isolé correspond donc à l'ensemble du contenu nucléolaire d'une cellule.

1. Régulation de la transcription par la séquestration nucléolaire: un mécanisme général pour réguler la transcription de certains gènes?

Dans un premier temps, il s'agit d'identifier les NADs dans différents organismes, dans différents tissus et lors du développement.

a) Dynamique des NADs lors du développement

La taille et l'activité du nucléole varient selon le type cellulaire. Par exemple, dans les cellules des feuilles, le volume représente entre 4 et 5% du volume nucléaire, tandis que dans certaines cellules de racines, ce volume peut atteindre jusqu'à 25% du volume nucléaire. Un aspect important de ce projet est d'évaluer l'impact de la régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire lors du développement de la plante. L'identification des NAD-gènes à partir de cellules de feuilles a révélé que pour certains d'entre eux, on observe une expression tissu-spécifique ou une induction lors de stress. Pour étudier la relation entre l'expression du gène et son association avec le nucléole, les NADs seront identifiés dans les différents tissus et à différents stades de développement. En parallèle, le niveau d'expression des NAD-gènes identifiés sera quantifié par des analyses transcriptomiques globales (séquençage haut débit) ou ciblées (RT-PCR quantitative).

Nous allons donc utiliser les feuilles pour analyser la dynamique des NADs lors d'étapes clefs du cycle de la vie de la plante. Les NAD-gènes seront par exemple identifiés :

(i) lors de la transition florale,

(ii) lors de la sénescence des feuilles,
(iii) dans différents types cellulaires.

(i) Lors de la transition florale, l'organisation et la compaction de la chromatine est altérée dans les cellules (Figure 19A ; (Tessadori et al. 2007)). Nous allons donc prélever les feuilles avant et après floraison pour identifier les NADs et analyser l'impact de la réorganisation nucléaire sur la dynamique des NADs.

(ii) Des analyses transcriptomiques ont révélé l'induction ou la répression de voies métaboliques spécifiques lors de la sénescence des feuilles (Breeze et al. 2011). Nous analyserons les NADs de feuilles avant et pendant la sénescence afin d'établir une possible corrélation entre cette réorganisation transcriptionnelle et l'identité des NAD-gènes

(iii) L'identification des NADs au sein de population de cellules homogènes est cruciale pour comprendre l'impact réel de la régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire. Après obtention de plantes transgéniques exprimant le marqueur nucléolaire FIB2 :YFP sous le contrôle de promoteurs tissus-spécifiques (Michniewicz et al. 2015), nous pourrons identifier les NADs dans différents types cellulaires (Figure 19B).

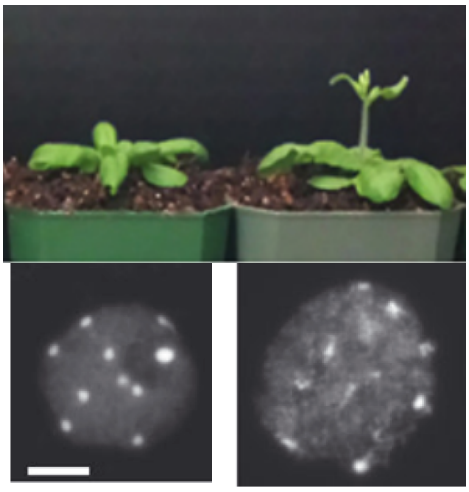
b) Dynamique des NADs dans différents contextes génomiques

Un aspect important de ce projet est de déterminer l'identité des NADs dans différents écotypes d'*A. thaliana*, mais aussi dans différentes espèces du genre Arabidopsis. Ce travail permettra d'une part d'analyser (i) l'impact de la régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire au sein des plantes hybrides, mais également (ii) la stabilité du contenu de l'ADN nucléolaire d'un point de vue évolutif.

(i) l'hétérosis ou vigueur hybride, est un phénomène observé dans les plantes hybrides avec des implications importantes pour la productivité agricole. Ainsi, les plantes hybrides exprimant une hétérosis forte présentent des capacités très nettement supérieures de résistance à la sécheresse, au froid, et à d'autres contraintes externes en général (Figure 20 ; (Birchler et al. 2010)). Au niveau moléculaire, on sait que l'hétérosis est due en grande partie à l'expression non-additive d'allèles provenant des deux parents (Chen 2010). Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette expression allélique différentielle restent mal connus. Une des hypothèses actuelles est que l'expression allélique différentielle résulte du choc de deux épigénomes différents, possédant des populations de petits ARN dissemblables (Chen 2013). Toutefois, d'autres mécanismes sont probablement impliqués puisque seule une fraction des allèles exprimés différemment dans l'hybride F1 est associée à des populations variables de petits ARN. De manière intéressante, l'analyse des NAD-gènes dans les cellules humaines avait permis de révéler qu'un seul des allèles pouvait s'associer avec le nucléole (van Koningsbruggen et al. 2010). Au sein de l'allotétraploïde *Arabidopsis suecica*, des centaines de gènes présentent une expression allélique différentielle (Wang et al. 2006) et une association avec le nucléole pourrait expliquer en partie cette expression différentielle.

Pour tester cette hypothèse, je propose d'identifier les NADs dans des plantes d'Arabidopsis soumises à un croisement intraspécifique (*A. thaliana* C24 / Landsberg erecta Ler) ou interspécifique (*Arabidopsis suecica*, allotétraploïde de *A. thaliana* et *A. arenosa*). Ces hybrides expriment tous deux un phénotype d'hétérosis fort et constituent donc de bons modèles d'études. Le marqueur FIB2:YFP sera introduit dans les parents et l'hybride pour

A. Transition florale



B. Promoteurs spécifiques de types cellulaires

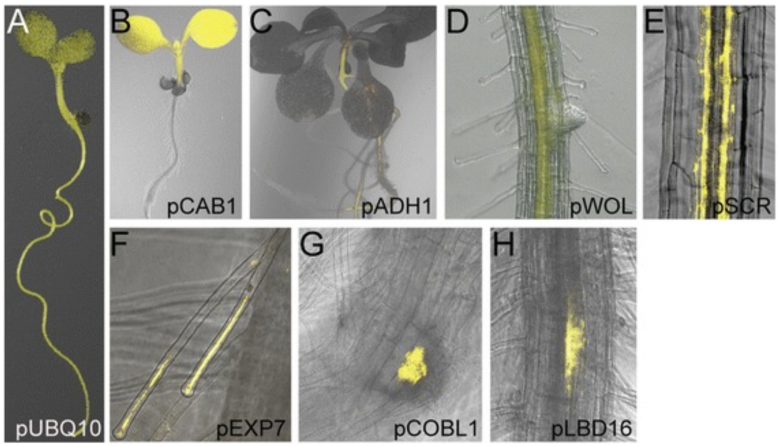


Figure 19: Identification des NADs lors de la transition florale ou de manière tissus-spécifiques
A. Lors de la transition florale, caractérisée par l'apparition d'une inflorescence (haut), l'organisation de l'hétérochromatine varie au sein du noyau, comme le montre les noyaux marqués au DAPI avant (gauche) et après (droite) la transition. (images provenant de Tessadori et al., 2007).
B. Expression de la YFP de manière tissus-spécifiques en utilisant les promoteurs décrits dans (Michniewicz et al., 2015).

A. Hybride intra-spécifique d'*A. thaliana*

B. Hybride inter-spécifique *Arabidopsis suecica*

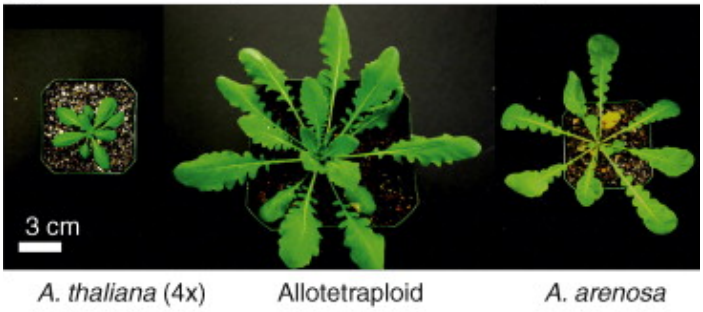


Figure 20: Hybrides d'*A. thaliana* et allotétraploïde *A. suecica*
Figure adaptée de (Chen et al., 2010) **A**. Plantes F1 issues du croisement entre les écotypes d'*A. thaliana* Col-0 et C24. **B**. Allotétraploïde stable (génération F8) maintenu par auto-fécondation.

permettre d'isoler l'ADN nucléaire et nucléolaire et réaliser le séquençage. L'origine parentale des NADs sera déterminée grâce aux polymorphismes nucléotidiques (SNPs) existants entre les deux génomes parentaux.

De plus, des analyses transcriptomiques seront réalisées pour corréler l'accumulation des transcrits avec l'association nucléolaire de chaque allèle. Les données seront ensuite validées par RT-PCR quantitatives.

c) Caractérisation fonctionnelle des NADs

Lien entre chromatine répressive et association nucléolaire

Les NADs identifiés dans les tissus foliaires sont enrichis en régions génomiques comportant des modifications de type répressif de la chromatine. Ces marques répressives incluent la méthylation de l'ADN dans les contextes CG, CHG et CHH (sachant que H peut être soit A, T ou C), ainsi que des modifications des histones (H3K9 et H3K27 méthylées). Dans les cellules humaines, les régions génomiques associées aux NADs et aux LADs affichent également des marques de chromatine inactive. Lorsque l'activité de l'H3K9 méthyltransférase G9a est affectée par des ARN interférents, le positionnement des LADs à la périphérie nucléaire est modifié (Kind et al. 2013). Il est probable qu'en affectant les voies de régulation impliquées dans la déposition des marques épigénétiques répressives au niveau des NADs, on affecte aussi l'association des NADs avec le nucléole.

Pour vérifier si il existe une relation entre association nucléolaire et état chromatinien, nous identifierons les NADs dans des mutants nuls pour des gènes codant des facteurs responsables des modifications répressives de la chromatine (Figure 21). Pour cela, le marqueur FIB2:YFP sera introduit dans les génotypes à analyser par croisement. Les NADs seront ensuite identifiés, et l'impact sur l'expression des NAD-gènes sera testé par séquençage et par RT-qPCR. De plus, ce lien entre état de la chromatine et association nucléolaire sera aussi testé en analysant les modification des cytosines par séquençage bisulfite ciblé, et en analysant les modifications des histones par immuno-précipitation de la chromatine (ChIP). Nous utiliserons également l'ensemble des données rendues disponibles par et pour la communauté scientifique (Stroud et al. 2013; Roudier et al. 2011; Sequeira-Mendes et al. 2014).

Lien entre identité des NADs et fonctions nucléolaires

Le nucléole est la conséquence de la biogenèse des ribosomes, qui commence par la transcription des gènes d'ARNr par l'ARN pol I. Ainsi, la taille et la structure du nucléole sont directement liées au taux de production des ribosomes, qui dépend lui-même des besoins de la cellule. En affectant ce processus biologique de base, c'est toute l'organisation nucléolaire que l'on affecte, provoquant ainsi des changements drastiques sur l'ensemble des voies de régulations nucléolaires. L'identification des NADs dans des conditions où la structure nucléolaire et la biogenèse des ribosomes sont perturbées devrait permettre d'apporter de nouvelles informations sur ces voies de régulations.

Pour tester cette hypothèse, les NADs seront identifiés dans une série de mutants nuls pour des gènes codant des facteurs impliqués dans la transcription et/ou la maturation des gènes d'ARNr, ou dans l'assemblage des protéines ribosomiques (Figure 21). Comme précédemment, le marqueur FIB2:YFP sera introduit dans les génotypes à analyser par croisement, pour identifier les NADs. L'impact sur l'expression des NAD-gènes sera testé par RT-qPCR ou séquençage haut débit.

	Nom mutant	Gène muté	Fonction	Impact du facteur: Sur les fonctions nucléolaires	Impact du facteur: Sur les régions centromériques et péri-centromériques	Références
Organisation nucléaire	*crown1, crown2*	***CROWN 1 et 2***	Organisation de la périphérie nucléaire	Inconnu	Impliqué dans l'organisation des centromères	(Dittmer et al., 2007; Wang et al., 2013)
	morc1, morc6	***MORC 1 et 6***	Organisation de la chromatine	Inconnu	Impliqué dans la condensation des régions péricentromériques	(Moissiard et al., 2012; 2014)
Modifications des histones	*ddm1*	***DDM1***	Remodelage de la chromatine	Impliquée dans la condensation des gènes d'ARNr	Impliquée dans la condensation de la chromatine et la répression des TEs	(Kanno *et al*., 2004; Jeddeloh *et al*., 1998; Zemach *et al*., 2013)
	*atxr5/6**	***ATXR5* and *ATXR6***	H3K27 mono-méthyltransférases	Impliquées dans l'expression des gènes d'ARNr	Impliquées dans la répression des TEs et la réplication de l'hétérochromatine	(Jacob *et al*., 2009, 2014; Pontvianne *et al*., 2013)
	suvh4	***SUVH4***	H3K9 di-méthyltransférases	aucun	Impliquée dans la répression des TEs	(Jackson *et al*., 2002; Sroud *et al*., 2013)
	*rts1-1**	***HDA6***	histone déacétylase	Impliquée dans l'expression et la condensation des gènes d'ARNr	Impliquée dans la répression des TEs	(Probst *et al*., 2004; Earley *et al*., 2010; Blevins *et al*., 2014)
DNA methylases	*met1-1**	***MET1***	CG ADN méthyltransférase	implicated in rRNA genes dosage control and condensation	Impliquée dans la répression des Tes et la condensation des régions péricentromériques	(Vongs *et al*. 1993; Pontvianne *et al*., 2013)
	cmt2	***CMT2***	CHG méthyltransférase	inconnu	Impliquée dans la répression des Tes et la condensation des régions péricentromériques	(Zemach *et al*., 2013; Stroud *et al*., 2014)
	dcc	***DRM1, DRM2* and *CMT3***	CHG et CHH méthyltransférases	mineur	Impliquées dans la répression des TEs	(Stroud *et al*., 2014)
RdDM	*nrpe1-11**	***NRPE1***	SSU catalytique de l'ARN pol V	mineur	Impliquées dans la répression des TEs	(Douet *et al*., 2009; unpublished data)
Chaperonne d'histones	*fas2-4**	***FASCIATA 2***	Chaperonnes d'histones	Impliquée dans la régulation du nombre et de l'expression des gènes d'ARNr	aucun	(Mozgova *et al*., 2010; Pontvianne *et al*., 2013)
Biogenèse des ribosomes	*rps5*	***RPS5***	Protéine ribosomique	Impliquée dans la biogenèse des ribosomes	aucun	(Weijers D *et al*., 2001)
	rps18	***RPS18***	Protéine ribosomique	Impliquée dans la biogenèse des ribosomes	aucun	(Van Lijsebettens *et al*., 1994)

Figure 21: Liste des mutants d'insertions qui seront analysés pour analyser le lien entre les NADs et l'organisation nucléaire, les modifications de la chromatine et la biogenèse des ribosomes.

2. Détection des NADs au niveau cellulaire à l'aide de nouvelles méthodes de visualisation de gènes simple copie

Il n'existe pas vraiment de méthode permettant de détecter la localisation de gènes simple copie en temps réel. A partir de tissus fixés, la technique padlock-FISH a récemment été utilisée pour visualiser le gène *CAB* inductible à la lumière, ainsi que le gène codant l'*Ubiquitine 11* (Feng et al. 2014a). Le padlock-FISH amplifie le signal grâce à des oligonucléotides circularisables spécifiques à la séquence à détecter. Je propose d'utiliser cette approche pour détecter des NADs à l'échelle cellulaire, tout en développant de nouvelles techniques d'imagerie de cellules vivantes pour suivre les NADs. Valider l'association nucléolaire des NAD-gènes par des approches d'imagerie est en effet un point majeur de ce projet.

a) Développement d'une nouvelle méthode de visualisation de gènes simple copie in planta

Nous allons tester deux approches qui ne devraient pas affecter localement l'organisation de la chromatine et la transcription :

(A) ANCHOR: une cassette unique qui permet de visualiser le site d'intégration de l'ADN-T.
(B) dCAS9 / CRISPR: une cassette qui permet de visualiser un site d'intérêt par l'intermédiaire de l'hybridation d'un ARN guide (ARNg).

Pour ces deux approches, un promoteur inductible permet l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée avec la eGFP de manière à obtenir un signal optimal. Nous proposons d'utiliser la Dexaméthasone (DEX) comme inducteur, car ce système fonctionne chez les plantes mono- et dicotylédones (Borghi 2010; Moore et al. 2006).

(A) Le système ANCHOR a été développé par l'utilisation de complexes nucléoprotéiques de type kinétochore impliqués lors de la ségrégation des chromosomes bactériens (Badrinarayanan et al. 2015). Un fragment d'ADN unique de 1 kb (*parS*), exempt de séquences répétées, permet la liaison de la protéine ParB. Dans ce cas, l'oligomérisation des protéines ParB crée des foyers fluorescents sans effet sur le contexte chromatinien voisin, ni sur l'activité transcriptionnelle. Cette technologie a été utilisée avec succès pour visualiser un locus unique dans des cellules de levure et des cellules humaines (Saad et al. 2014). Un brevet détenu par le CNRS et dont le prof. Kerstin Bystricky (LBME, Université de Toulouse, France) est co-inventeur régule son utilisation chez les eucaryotes (Numéro de la demande: 20140045262). Sur les conseils du prof. Kerstin Bystricky, nous développons une cassette qui permettrait d'utiliser le système ANCHOR chez les plantes (Figure 22A). Nous avons déjà réalisé cette cassette et des plantes transgéniques sont en cours d'obtention. Afin de visualiser le locus ciblé *in planta*, une accumulation optimale de la protéine de fusion ParB:GFP est nécessaire. Pour cela, différentes concentrations de DEX seront testées. L'ensemble du système (promoteurs, parB :GFP et parS) constitue le même transgène.

(B) Le système CRISPR/Cas9 permet la liaison de la protéine (Cas9) à un locus d'intérêt dans le génome par l'hybridation d'un ARN guide (ARNg)

A. Cassette ANCHOR

B. Cassette CRISPR/dCas9

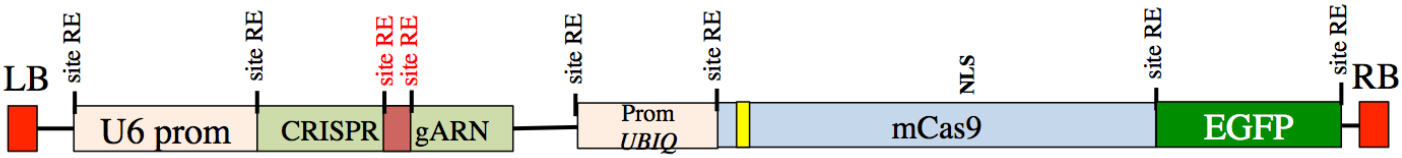


Figure 22: Représentation schématique des cassettes ANCHOR et CRISPR/Cas9 .

A-B. Les bordures LB et RB rendent cette cassette compatible avec le système de clonage Gateway (Invitrogen). De plus, de nombreux sites uniques de restrictions (site RE) permettent de modifier le contenu des cassettes. Un marqueur de sélection est également présent dans ces cassettes pour sélectionner les plantes transformées**. A**. La protéine de fusion ParB:GFP est exprimée sous le contrôle du promoteur inductible à la Dexaméthasone. Après un espaceur d'environ 1 kb se trouve la séquence cible ParS**. B**. L'ARN guide est exprimé sous le contrôle du promoteur U6. La dCas9 fusionnée à la GFP est elle exprimée sous le contrôle du promoteur Ubiquitine.

spécifique de ce locus. Cette technique a été utilisée avec succès dans les plantes pour modifier des séquences géniques (Feng et al. 2014b; Jiang et al. 2013). Dans les cellules humaines, un système utilisant un mutant catalytique de Cas9 pour son activité endonucléase (dCaS9 pour « dead » Cas9) fusionné à la eGFP a permis de visualiser certains gènes ou éléments répétés avec succès (Chen et al. 2013). L'ARN guide permet d'hybrider la dCaS9 au niveau du site à détecter et en l'absence de l'activité endonucléase, l'interaction dCaS9:eGFP/gène cible est stable. Afin d'utiliser ce système d'imagerie en temps réel, la cassette qui permettra d'exprimer la dCaS9:eGFP via le système inductible DEX, ainsi qu'un ou plusieurs ARNg est actuellement en cours de réalisation (Figure 22B). Pour pouvoir détecter le signal, la présence d'au moins 10 cibles adjacentes est nécessaire. Les séquences télomériques sont donc une cible de choix pour tester ce système *in planta*. Les groupements de gènes d'ARNt sont une seconde possibilité pour notre projet car ils font partie des gènes les plus enrichis parmi les NAD-gènes (voir article3.2).

Les lignées transformées seront analysées par microscopie confocale. En cas d'obtention de données pertinentes, l'analyse de ces plantes sera également réalisée en utilisant des microscopes plus résolutifs sur des plateformes régionales comme à l'observatoire de Banyuls-sur-Mer, à Toulouse ou Montpellier.

En parallèle, ces approches seront validées par des techniques indépendantes. Ainsi, la co-localisation des télomères et des complexes CRISPR/dCaS9 pourra être réalisée par FISH et immunolocalisation de la eGFP, ou par ChIP entre dCas9/ARNg/télomères. Dans le cas du système ANCHOR, la technique de ChIP sera utilisée pour valider *in vivo* l'interaction entre parB:GFP et la séquence *ParS*.

b) Visualisation des NADs au niveau cellulaire

Parmi les NADs identifiés dans les feuilles, certains sont présents dans des régions génomiques très peu associées au nucléole. Dans ce cas, leur association avec le nucléole pourrait être la conséquence d'un processus spécifique, au moins partiellement séquence-dépendant. Donc, l'intégration d'un NAD à un endroit différent dans le génome devrait conduire à sa réassociation avec le nucléole. Pour tester cette hypothèse, nous procéderons à la localisation subnucléaire de trois à cinq NADs indépendants en utilisant quatre approches différentes. Le système ANCHOR et le système de CRIPSR/dCas9 correspondent aux principales méthodes, mais deux autres méthodes pourraient être utilisées si les deux premières approches se révèlent infructueuses.

Méthode 1*: détection de NADs néo-intégrés (néo-NADs) avec ANCHOR*

Trois à cinq NADs, contenant des gènes présents au milieu de grandes régions génomiques ayant des caractéristiques euchromatiques, seront sélectionnés. Seuls les NADs possédant des NAD-gènes fortement associés au nucléole (voir Figure 5C de l'article section IV.A) et exprimés en cas de stress seront choisis ici. Une fois clonés, une séquence *ParS* du système ANCHOR sera fusionnée à chacun des néo-NADs, avant de les réintégrer dans des plantes sauvages.

En parallèle, une cassette ANCHOR ne contenant pas la séquence *ParS* sera préparée. Cette nouvelle cassette sera intégrée dans les plantes sauvages et les transformants seront sélectionnés. Ensuite, les plantes portant chaque transgène seront croisées afin d'avoir les deux transgènes co-ségrégeant dans la même plante (Figure 23A). Après induction DEX, les

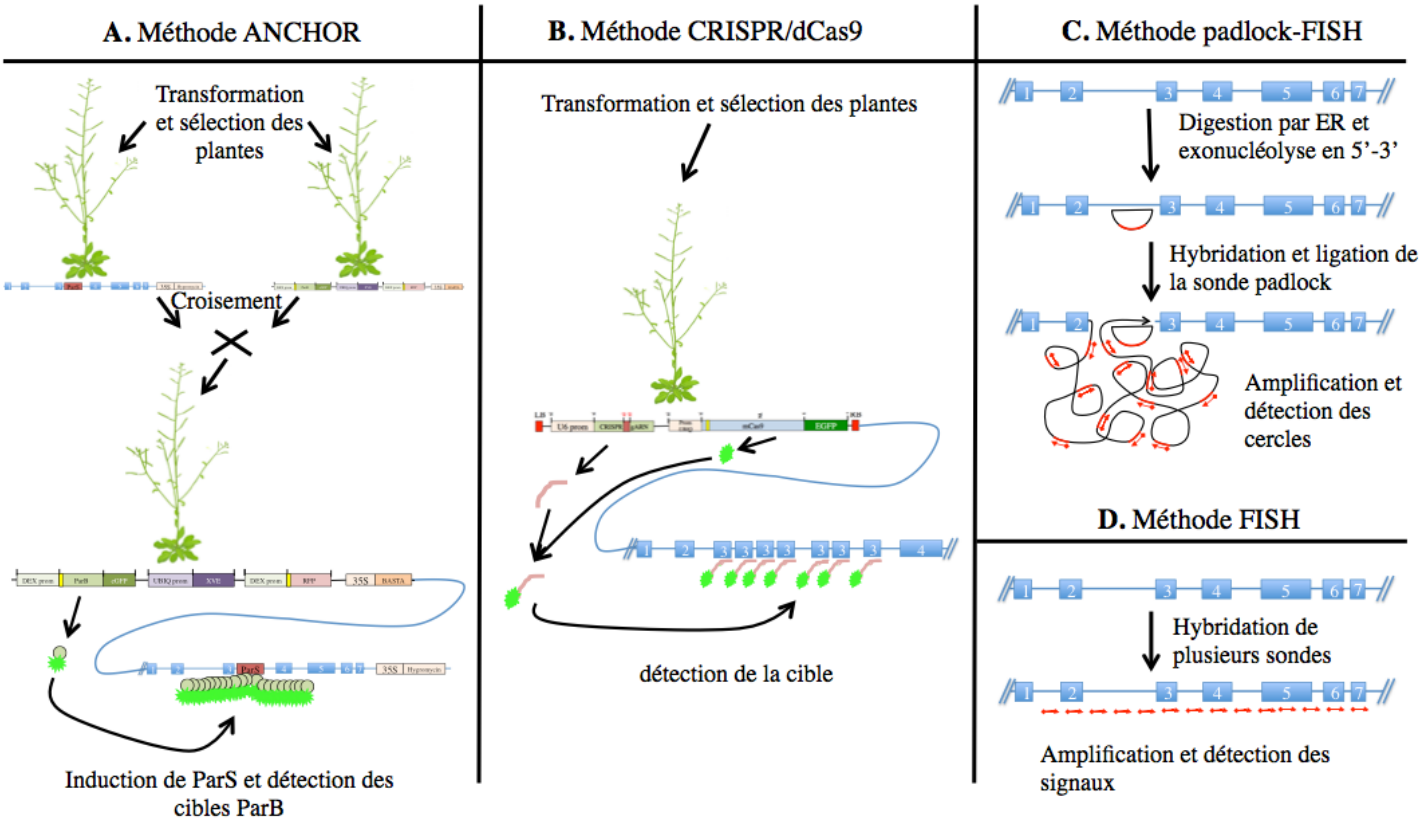


Figure 23: Méthodes utilisées pour détecter la position des NADs à l'échelle de la cellule
Plusieurs méthodes seront testées pour augmenter nos chances de détecter les NADs dans le noyau: la méthode ANCHOR (A), CRISPR/Cas9 (B), padlock-FISH (C) et FISH optimisée (D).

néo-NADs seront visualisés à partir de noyaux fixés ou *in planta* pour valider leur localisation subnucléaire par microscopie confocale.

Méthode 2: *détection de NAD natifs avec CRISPR/dCas9*

Certains NADs contiennent naturellement quelques séquences répétées de 15-20 nt qui peuvent être utilisées pour concevoir un ARN guide (ARNg), ce qui permettra de les cibler spécifiquement de manière multiple. La cassette développée pour le système CRISPR/dCas9 est conçue de sorte que la séquence ARNg peut être facilement remplacée par une autre. Après modification de l'ARNg, la cassette CRISPR/dCas9 sera introduite dans des plantes sauvages, puis utilisée pour visualiser le positionnement subnucléaire du NAD ciblé par microscopie confocale (Figure 23B).

Méthode 3: *détection de NAD natifs par padlock-FISH*

La méthode de padlock-FISH permet de détecter *in situ* des gènes simple copie à partir de tissus fixés. Cette méthode est donc une alternative intéressante qui a par ailleurs déjà été utilisée avec succès chez *A. thaliana*. Des sondes spécialement conçues pour s'hybrider avec les NADs d'intérêt sélectionnés pour la méthode 1 seront synthétisées. L'hybridation sera réalisée selon le protocole publié dans (Feng et al. 2014a) (figure 23C).

Méthode 4: *détection de loci uniques par FISH*

Une autre option consiste à utiliser la technique de FISH avec quelques modifications pour augmenter son efficacité à détecter des gènes simple copie. Typiquement, les sondes FISH sont composées d'un seul fragment d'ADN marqué à la digoxigénine-dUTP-11 (DIG). Le signal est ensuite amplifié par un « sandwich » à base d'anticorps, comme décrit dans (Pontvianne et al. 2012). Je propose ici de synthétiser jusqu'à 30 sondes différentes de 35-40nt, marquées avec un fluorophore, qui s'hybrideront le long de la séquence génomique ciblée tous les 100-200nt (Figure 23D). Si le signal est trop faible pour être détecté, il peut facilement être amplifié au moyen d'un « sandwich » constitué d'anticorps contre le fluorophore.

Enfin, une dernière option consiste à utiliser des BACs comme sondes pour détecter les NADs par FISH. Cette technique a couramment été utilisée chez les plantes, y compris *A. thaliana* et ne devrait pas poser de problèmes techniques (Fransz et al. 2002). Cependant, en utilisant des BAC, les loci génomiques ciblés présentent des séquences allant de 50 à 150 kb, donc seuls les plus grands NADs (entre 25 et 80 kb) peuvent être analysés par cette approche.

Une fois identifiées, les lignées les plus intéressantes seront analysées par microscopie hyper-résolutive auprès de la plateforme MRI de Montpellier.

3. Dynamique des NADs en cas de stress

Les NAD-gènes identifiés à partir de feuilles sont peu ou pas transcrits. Néanmoins, certains d'entre eux sont exprimés en cas de stress. Lorsque ces NAD-gènes sont exprimés, ils devraient perdre leur association avec le nucléole, ainsi que les marques répressives associées sur la chromatine. L'ARN pol II étant exclue du nucléole, pour devenir activement transcrits, les NAD-gènes doivent devenir accessibles à celle-ci. Nous testerons ces hypothèses en analysant la dynamique de NAD-gènes lorsqu'ils sont activement transcrits en cas de stress.

a) Identification des NADs en cas de stress abiotique

Les NADs seront identifiés dans des plantes soumises à des stress qui affectent la croissance et le développement: (i) le stress thermique et (ii) la disponibilité en Fe.

(i) stress thermique:

Dans les cellules de mammifères, le nucléole joue un rôle important dans la réponse aux stress ((Boulon et al. 2010) et paragraphe II.A.4). Mais si l'existence de tels mécanismes reste à démontrer dans les cellules végétales, plusieurs indications présentées dans la section II.D (Figures 15-16) semblent néanmoins indiquer qu'ils sont conservés chez les plantes. Par exemple, la distribution de la FIB2:YFP au niveau du DFC est affectée en cas de stress par la chaleur et cette désorganisation s'accompagne d'une accumulation de ncrRNA au niveau des gènes d'ARNr 45S. La structure du nucléole étant étroitement liée à sa fonction et à son activité, il est fort probable que le stress thermique affecte la biogenèse des ribosomes.

Pour déterminer si cette désorganisation affecte la dynamique des NADs, on les recherchera dans des feuilles de plantes de 3 semaines ayant subi ou non un choc thermique de 24h à 37°C.

(ii) Excès de Fe

La concentration en Fe dans le nucléole est la plus forte mesurée dans les compartiments intracellulaires des cellules végétales (Paragraphe III.A, (Roschzttardtz et al. 2011). Bien que le rôle de ce pool de Fe reste inconnu, il semble qu'un lien existe avec la biogenèse des ribosomes (Figure 10). Par ailleurs, un excès de Fe induit une relocalisation de la FIB2:YFP du DFC vers l'ensemble du nucléole, comme en cas de stress thermique. Comprendre les conséquences de cet excès sur l'organisation du noyau est donc essentiel pour mieux appréhender son impact sur les fonctions nucléaires, et plus particulièrement sur la dynamique des NADs. Ceux-ci seront donc identifiés à partir de feuilles de plantes traitées par excès de Fe (500 mM de citrate de Fe) ou en conditions standard (50 mM de citrate de Fe).

Dans ces deux cas, l'identification des NADs sera accompagnée d'une analyse systématique de l'expression des NAD-gènes associés dans les conditions contrôles ou de stress.

b) Visualisation de la réactivation des NAD-gènes en cas de stress

Après leur réactivation, les NAD-gènes devraient perdre leur association avec le nucléole afin d'accéder à une zone nucléaire où leur transcription est possible. Cependant, ces changements de positions nucléaires et d'expression sont vraisemblablement accompagnés d'un changement de la chromatine associée. Quels mécanismes précèdent la cascade d'évènements nécessaires à la réactivation d'un gène ? La perte de l'association nucléolaire ? La perte des marques répressives associées au locus réactivé ? Quelques-uns des scénarios envisageables sont illustrés dans la Figure 24.

Pour analyser les différentes étapes nécessaires à l'activation transcriptionnelle des NAD-gènes, je propose d'utiliser les méthodes ANCHOR ou CRISPR/dCas9 développés dans la partie 2.2. Des NAD-gènes inductibles par la chaleur seront utilisés pour cette étude. Leur position par rapport au nucléole sera mesurée avant et après le stress thermique. Le laboratoire possède un microscope confocal équipé d'une chambre thermostatée qui nous permettra de contrôler la température de la plante en cours d'analyse.

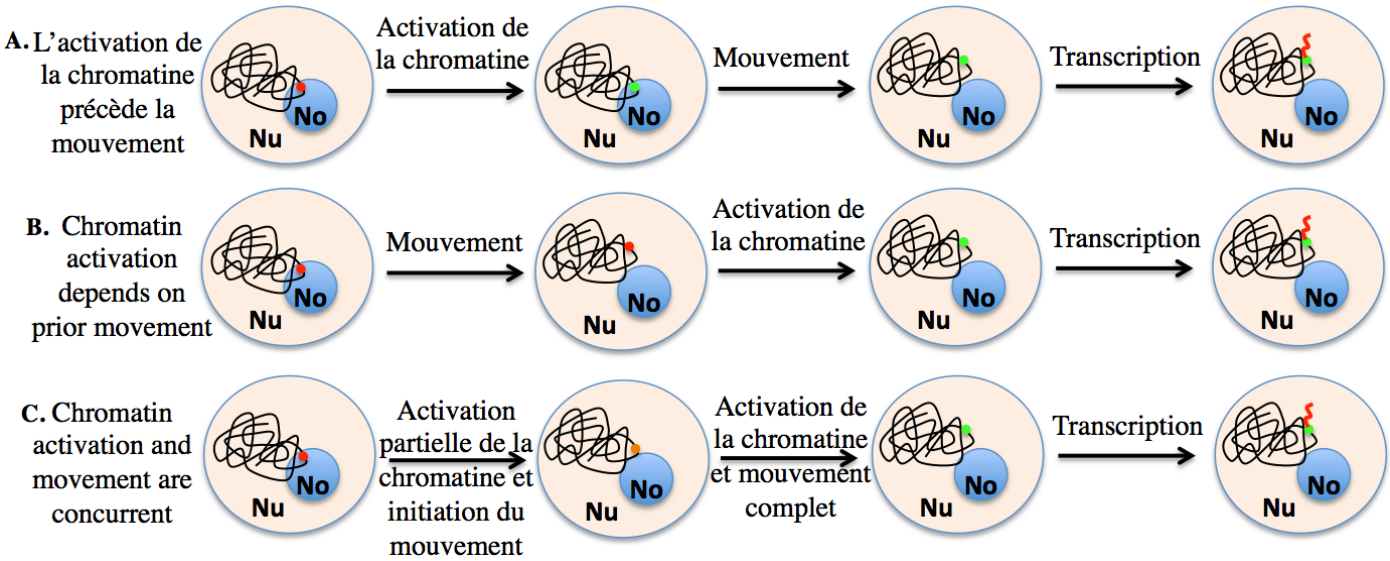


Figure 24: Scénarios possibles lors de l'activation transcriptionnelle de NAD-gènes
A. Des modifications de la chromatine faisant passer le NAD-gène d'un état réprimé à permissif est nécessaire avant le mouvement du **B**. Le mouvement du NAD-gène est nécessaire avant un changement d'état de la chromatine. **C**. Le mouvement du NAD-gène et le changement de l'Etat de la chromatine sont tous deux nécessaires.

Le temps de latence requis pour la réactivation transcriptionnelle du NAD-gène étudié sera d'abord analysé par RT-PCR quantitative. Les modifications de la chromatine pendant cette réactivation seront analysées par ChIP et séquençage bisulfite. Ensuite, les plantes possédant un transgène composé d'un NAD (induit par le stress) couplé à la séquence *ParS* seront utilisées pour suivre *in vivo* le positionnement des néo-NADs durant leur activation transcriptionnelle (Méthode 1: ANCHOR partie 2.2). Le changement de position associé à l'activation d'un NAD-gène sera également analysé dans des mutants de facteurs nécessaires pour effacer les marques de chromatine silencieuse, comme des ADN ou des histones déméthylases.

Conclusions :

Ce projet devrait permettre de caractériser une nouvelle voie de régulation de l'expression des gènes en utilisant de nouvelles techniques (Figure 25). La cartographie des NADs au cours du développement, dans différents tissus ou dans différents contextes génomiques permettra ainsi d'appréhender l'importance de cette voie de régulation au cours de la vie de la plante. Par ailleurs, l'identification des NADs dans des mutants ayant une régulation épigénétique ou un nucléole perturbé révélera les mécanismes impliqués dans cette régulation.

La mise en place de méthodes de détection de gènes simple copie à l'échelle de la cellule est un aspect important de ce projet. Ces méthodes nous permettront de compléter les données obtenues par séquençage haut débit. En outre, ces méthodes ouvriront de nouvelles perspectives sur l'étude du rôle de la position d'un gène et de la régulation de son expression. Jusqu'à quel point cette position est importante? Quelle est la dynamique du positionnement des gènes ? Ces données, ainsi que les méthodes développées à travers ce projet devraient ainsi être utiles à l'ensemble de la communauté scientifique qui tente de répondre à ces questions.

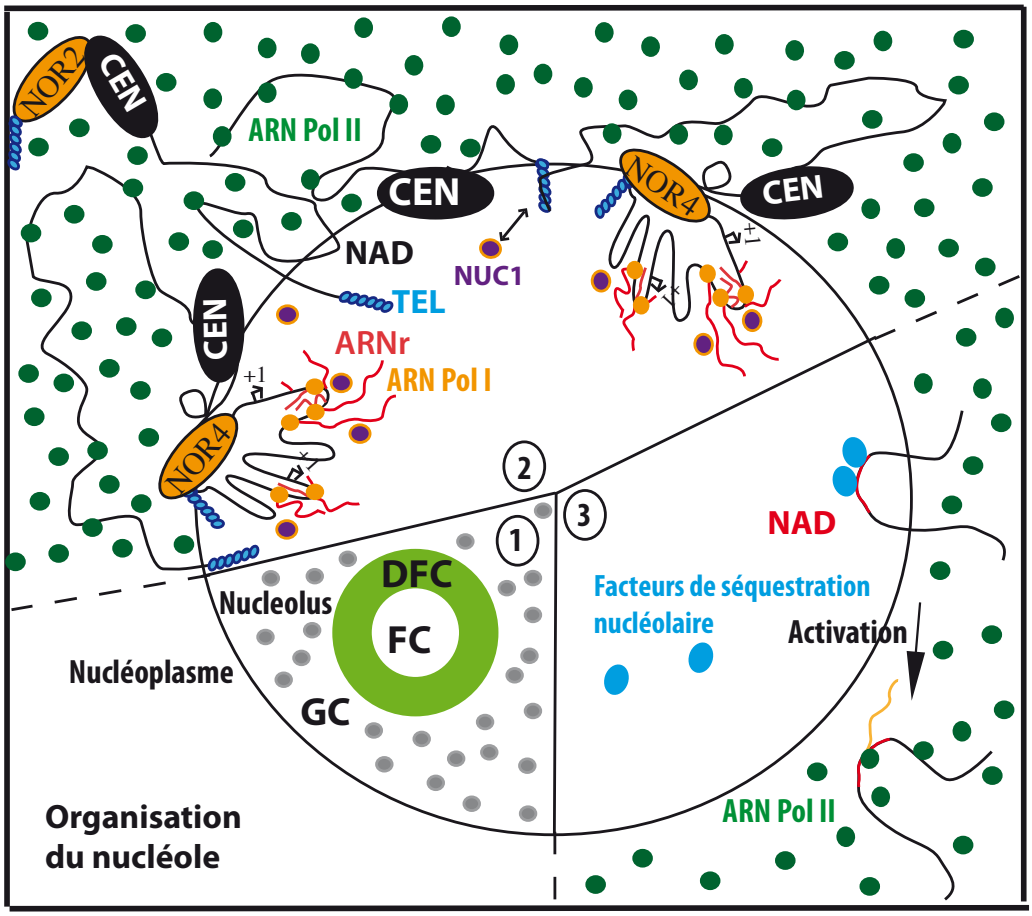


Figure 25: Rôle du nucléole dans l'organisation du génome et l'expression de certains gènes chez *A. thaliana*

1. Le nucléole est composé de trois compartiments majeurs (le centre fibrillaire FC, le composé fibrillaire dense DFC et le composé granulaire GC). **2.** Une partie des gènes d'ARNr 45S provenant du NOR4 sont associés au nucléole et activement transcrits, à l'inverse de ceux présents sur le NOR2. L'ensemble du bras court du chromosome 4 et les régions télomériques (TEL) sont également associés au nucléole. Le nucléole offre un large volume d'où l'ARN pol II est exclue, mais où certains gènes sont potentiellement séquestrés (NAD). **3**. Certains gènes, potentiellement contenus dans le nucléole *via* l'intervention de facteurs de séquestration nucléolaire, pourraient perdre cette association lors de leur réactivation transcriptionnelle.

VII. Conclusions générales:

Le fait que le nucléole soit facilement décelable en absence même de toute coloration, a fait de ce corps nucléaire, aussi appelé « noyau du noyau », le sujet favori de nombreux chercheurs depuis des décennies. Si la plupart des premiers travaux étaient très descriptifs, de nombreuses études ont depuis permis de percer les mécanismes moléculaires dont le nucléole est le siège. Ainsi, beaucoup d'hypothèses ont émergé grâce à des études réalisées sur le nucléole, et s'avèrent également pertinentes dans d'autres contextes. Par exemple, les études réalisées sur la transcription des ARN ribosomiques par l'ARN polymérase I ont permis d'établir d'importants concepts sur la transcription.

Les travaux et les perspectives présentés tout au long de ce manuscrit s'inscrivent dans cette tradition d'étudier de nouvelles hypothèses en utilisant le nucléole comme modèle d'étude. Par exemple, la régulation de la fonction de protéines par séquestration nucléolaire est un concept qui, du fait des évidences obtenues à partir de cellules animales, s'impose peu à peu comme une nouvelle voie de régulation. Toutefois, cette régulation par séquestration n'est probablement pas spécifique au nucléole. Il existe en effet de nombreux sites plus ou moins discrets au sein d'une cellule pour « se cacher ».

Dans les années à venir, mon travail aura pour but de démontrer l'existence ou non d'une voie de régulation transcriptionnelle par séquestration nucléolaire en utilisant la stratégie présentée dans la section V. A (Figure 25). Cependant, à plus long terme, une des aspects qui pourra être abordé, sera de déterminer si cette séquestration est le fruit d'un processus actif ou passif. En d'autres termes, existent-ils des facteurs interagissant directement ou non avec les NADs et qui permettent de les associer et/ou les maintenir associés au nucléole?

La cartographie systématique des NADs dans différents types cellulaires, lors de phases spécifiques du développement ou en cas de stress, permettra d'appréhender l'impact potentiel de cette voie de régulation sur l'expression des gènes. Agit-elle sur la régulation de nombreux gènes ou seulement sur certains d'entre eux. Dans tous les cas, cette approche devrait apporter de nouveaux éléments sur le rôle de l'organisation nucléaire et sur la régulation de l'expression des gènes, en d'autres termes: « Est-ce que vraiment la position d'un gène au sein du noyau influe sur son expression?

VIII. Références

Allain FH, Bouvet P, Dieckmann T, Feigon J. 2000a. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J* **19**: 6870–6881.

Allain FH, Gilbert DE, Bouvet P, Feigon J. 2000b. Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol* **303**: 227–241.

Angel A, Song J, Dean C, Howard M. 2011. A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature* **476**: 105–108.

Aoyama T, Chua NH. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J Cell Mol Biol* **11**: 605–612.

Armstrong SJ, Franklin FC, Jones GH. 2001. Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in Arabidopsis thaliana. *J Cell Sci* **114**: 4207–4217.

Audas TE, Jacob MD, Lee S. 2012a. Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol Cell* **45**: 147–157.

Audas TE, Jacob MD, Lee S. 2012b. The nucleolar detention pathway: A cellular strategy for regulating molecular networks. *Cell Cycle Georget Tex* **11**: 2059–2062.

Austriaco NRJ, Guarente LP. 1997. Changes of telomere length cause reciprocal changes in the lifespan of mother cells in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9768–9772.

Badrinarayanan A, Le TBK, Laub MT. 2015. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 171–199.

Bantignies F, Roure V, Comet I, Leblanc B, Schuettengruber B, Bonnet J, Tixier V, Mas A, Cavalli G. 2011. Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in Drosophila. *Cell* **144**: 214–226.

Belton J-M, McCord RP, Gibcus JH, Naumova N, Zhan Y, Dekker J. 2012. Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods San Diego Calif* **58**: 268–276.

Benoit M, Layat E, Tourmente S, Probst AV. 2013. Heterochromatin dynamics during developmental transitions in Arabidopsis - a focus on ribosomal DNA loci. *Gene* **526**: 39–45.

Berger AB, Cabal GG, Fabre E, Duong T, Buc H, Nehrbass U, Olivo-Marin J-C, Gadal O, Zimmer C. 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods* **5**: 1031–1037.

Berry S, Dean C. 2015. Environmental perception and epigenetic memory: mechanistic insight through FLC. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 133–148.

Berry S, Hartley M, Olsson TSG, Dean C, Howard M. 2015. Local chromatin environment of a Polycomb target gene instructs its own epigenetic inheritance. *eLife* **4**. e07205

Bickmore WA, van Steensel B. 2013. Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* **152**: 1270–1284.

Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S, Vaiman D, Veitia RA. 2010. Heterosis. *Plant Cell* **22**: 2105–2112.

Blevins T, Pontvianne F, Cocklin R, Podicheti R, Chandrasekhara C, Yerneni S, Braun C, Lee B, Rusch D, Mockaitis K, et al. 2014. A two-step process for epigenetic inheritance in Arabidopsis. *Mol Cell* **54**: 30–42.

Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 574–585.

Borghi L. 2010. Inducible gene expression systems for plants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **655**: 65–75.

Boudonck K, Dolan L, Shaw PJ. 1999. The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* **10**: 2297–2307.

Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert F-M, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**: 216–227.

Bourbousse C, Mestiri I, Zabulon G, Bourge M, Formiggini F, Koini MA, Brown SC, Fransz P, Bowler C, Barneche F. 2015. Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E2836–2844.

Bouvet P, Allain FH, Finger LD, Dieckmann T, Feigon J. 2001. Recognition of pre-formed and flexible elements of an RNA stem-loop by nucleolin. *J Mol Biol* **309**: 763–775.

Brangwynne CP, Mitchison TJ, Hyman AA. 2011. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in Xenopus laevis oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4334–4339.

Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y-S, Penfold CA, Jenkins D, et al. 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**: 873–894.

Brennecke P, Anders S, Kim JK, Kolodziejczyk AA, Zhang X, Proserpio V, Baying B, Benes V, Teichmann SA, Marioni JC, et al. 2013. Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods* **10**: 1093–1095.

Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F. 2010. Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* **1800**: 806–814.

BROWN DD, GURDON JB. 1964. ABSENCE OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS IN THE ANUCLEOLATE MUTANT OF XENOPUS LAEVIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 139–146.

Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**: E107–112.

Carneiro T, Carvalho C, Braga J, Rino J, Milligan L, Tollervey D, Carmo-Fonseca M. 2007. Depletion of the yeast nuclear exosome subunit Rrp6 results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. *Mol Cell Biol* **27**: 4157–4165.

Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**: 427–439.

Caudron-Herger M, Pankert T, Seiler J, Nemeth A, Voit R, Grummt I, Rippe K. 2015. Alu element-containing RNAs maintain nucleolar structure and function. *EMBO J* **34**: 2758–2774.

Chandrasekhara C, Mohannath G, Blevins T, Pontvianne F, Pikaard CS. 2016. Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev* **30**: 177–190.

Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G-W, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, et al. 2013. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* **155**: 1479–1491.

Chen M, Galvao RM, Li M, Burger B, Bugea J, Bolado J, Chory J. 2010. Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell* **141**: 1230–1240.

Chen M, Schwab R, Chory J. 2003. Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14493–14498.

Chen ZJ. 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nat Rev Genet* **14**: 471–482.

Chen ZJ. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci* **15**: 57–71.

Cisse II, Izeddin I, Causse SZ, Boudarene L, Senecal A, Muresan L, Dugast-Darzacq C, Hajj B, Dahan M, Darzacq X. 2013. Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science* **341**: 664–667.

Collier S, Pendle A, Boudonck K, van Rij T, Dolan L, Shaw P. 2006. A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **17**: 2942–2951.

Comella P, Pontvianne F, Lahmy S, Vignols F, Barbezier N, Debures A, Jobet E, Brugidou E, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2008. Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **36**: 1163–1175.

Cook PR. 1999. The organization of replication and transcription. *Science* **284**: 1790–1795.

Copenhaver GP, Pikaard CS. 1996. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of Arabidopsis thaliana adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J Cell Mol Biol* **9**: 259–272.

Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe. *Ann Bot* **103**: 1–11.

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* **295**: 1306–1311.

Deltour R, de Barsy T. 1985. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J Cell Sci* **76**: 67–83.

de Nadal E, Ammerer G, Posas F. 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* **12**: 833–845.

Derenzini M, Thiry M, Goessens G. 1990. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **38**: 1237–1256.

Dieppois G, Stutz F. 2010. Connecting the transcription site to the nuclear pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *J Cell Sci* **123**: 1989–1999.

Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN. 2008. Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* **320**: 942–945.

Dittmer TA, Stacey NJ, Sugimoto-Shirasu K, Richards EJ. 2007. LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **19**: 2793–2803.

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. *Plant Cell* **26**: 1330–1344.

Durut N, Saez-Vasquez J. 2015. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene* **556**: 7–12.

Dvorackova M, Fojtova M, Fajkus J. 2015. Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 18–37.

Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* **24**: 1119–1132.

Efroni I, Ip P-L, Nawy T, Mello A, Birnbaum KD. 2015. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol* **16**: 9.

Exner V, Taranto P, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L. 2006. Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Dev Camb Engl* **133**: 4163–4172.

Falahati H, Pelham-Webb B, Blythe S, Wieschaus E. 2016. Nucleation by rRNA Dictates the Precision of Nucleolus Assembly. *Curr Biol CB* **26**: 277–285.

Falkan S. High resolution autoradiography studies on chromatin functions. *1978* 3–53.

Fang Y, Hearn S, Spector DL. 2004. Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* **15**: 2664–2673.

Fang Y, Spector DL. 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol CB* **17**: 818–823.

Feng C-M, Qiu Y, Van Buskirk EK, Yang EJ, Chen M. 2014a. Light-regulated gene repositioning in Arabidopsis. *Nat Commun* **5**: 3027.

Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, et al. 2014b. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 4632–4637.

Ferro M, Brugiere S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M,

Le Gall S, et al. 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics MCP* **9**: 1063–1084.

Filion GJ, van Bemmel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, et al. 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* **143**: 212–224.

Flutre T, Duprat E, Feuillet C, Quesneville H. 2011. Considering transposable element diversification in de novo annotation approaches. *PloS One* **6**: e16526.

Fontana F. 1781. traité sur le venin de la vipère [...] avec des observations sur la structure primitive du corps animale [...].

Fransz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. 2002. Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14584–14589.

Gall JG. 2003. The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 975–980.

Ganot P, Jady BE, Bortolin ML, Darzacq X, Kiss T. 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol* **19**: 6906–6917.

Gibcus JH, Dekker J. 2013. The hierarchy of the 3D genome. *Mol Cell* **49**: 773–782.

Granneman S, Baserga SJ. 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 281–286.

Graumann K, Evans DE. 2011. Nuclear envelope dynamics during plant cell division suggest common mechanisms between kingdoms. *Biochem J* **435**: 661–667.

Graumann K, Evans DE. 2010. Plant SUN domain proteins: components of putative plant LINC complexes? *Plant Signal Behav* **5**: 154–156.

Grillet L, Mari S, Schmidt W. 2014. Iron in seeds - loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* **4**: 535.

Grob A, Colleran C, McStay B. 2014. Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes Dev* **28**: 220–230.

Grob S, Schmid MW, Luedtke NW, Wicker T, Grossniklaus U. 2013. Characterization of chromosomal architecture in Arabidopsis by chromosome conformation capture. *Genome Biol* **14**: R129.

Grummt I, Langst G. 2013. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 393–404.

Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, et al. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**: 948–951.

Guidi M, Ruault M, Marbouty M, Loiodice I, Cournac A, Billaudeau C, Hocher A, Mozziconacci J,

Koszul R, Taddei A. 2015. Spatial reorganization of telomeres in long-lived quiescent cells. *Genome Biol* **16**: 206.

Gu J, Patton JR, Shimba S, Reddy R. 1996. Localization of modified nucleotides in Schizosaccharomyces pombe spliceosomal small nuclear RNAs: modified nucleotides are clustered in functionally important regions. *RNA N Y N* **2**: 909–918.

Hacot S, Coute Y, Belin S, Albaret MA, Mertani HC, Sanchez J-C, Rosa-Calatrava M, Diaz J-J. 2010. Isolation of nucleoli. *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al* **Chapter 3**: Unit3.36.

Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Good PD, Gipson TA, Engelke DR. 2008. Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev* **22**: 2204–2214.

Hallais M, Pontvianne F, Andersen PR, Clerici M, Lener D, Benbahouche NEH, Gostan T, Vandermoere F, Robert M-C, Cusack S, et al. 2013. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1358–1366.

Heacock M, Spangler E, Riha K, Puizina J, Shippen DE. 2004. Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *EMBO J* **23**: 2304–2313.

Heard E, Bickmore W. 2007. The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 311–316.

Heitz E. 1931. Nukleolen und Chromosomen in der Gattung Vicia. *Planta* **15**: 495–505.

Hernandez-Verdun D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucl Austin Tex* **2**: 189–194.

Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J. 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* **115**: 2265–2270.

Hiscox JA. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**: 119–127.

Hiscox JA, Whitehouse A, Matthews DA. 2010. Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* **10**: 4077–4086.

Houseley J, Tollervey D. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**: 763–776.

Hozak P, Novak JT, Smetana K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* **66**: 225–233.

Ide S, Miyazaki T, Maki H, Kobayashi T. 2010. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**: 693–696.

Ito H, Kakutani T. 2014. Control of transposable elements in Arabidopsis thaliana. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* **22**: 217–223.

Jacob MD, Audas TE, Uniacke J, Trinkle-Mulcahy L, Lee S. 2013. Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. *Mol Biol Cell* **24**: 2943–2953.

Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD. 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 763–768.

Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. 2006. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* **17**: 944–954.

Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* **41**: e188.

Johnson FB, Marciniak RA, Guarente L. 1998. Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 332–338.

Kannan K, Nelson ADL, Shippen DE. 2008. Dyskerin is a component of the Arabidopsis telomerase RNP required for telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **28**: 2332–2341.

Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in Drosophila melanogaster. *Nature* **471**: 480–485.

Kim SH, Koroleva OA, Lewandowska D, Pendle AF, Clark GP, Simpson CG, Shaw PJ, Brown JWS. 2009. Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell* **21**: 2045–2057.

Kim SH, Macfarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, Haupt S, Brown JWS, Taliansky M. 2007a. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11115–11120.

Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JWS, Taliansky M. 2007b. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* **26**: 2169–2179.

Kind J, Pagie L, de Vries SS, Nahidiazar L, Dey SS, Bienko M, Zhan Y, Lajoie B, de Graaf CA, Amendola M, et al. 2015. Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell* **163**: 134–147.

Kind J, Pagie L, Ortabozkoyun H, Boyle S, de Vries SS, Janssen H, Amendola M, Nolen LD, Bickmore WA, van Steensel B. 2013. Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* **153**: 178–192.

Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.

Lange H, Holec S, Cognat V, Pieuchot L, Le Ret M, Canaday J, Gagliardi D. 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.

Lange H, Zuber H, Sement FM, Chicher J, Kuhn L, Hammann P, Brunaud V, Berard 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 Genet* **10**: e1004564.

Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357–359.

Lee JH, Lee YS, Jeong SA, Khadka P, Roth J, Chung IK. 2014. Catalytically active telomerase

holoenzyme is assembled in the dense fibrillar component of the nucleolus during S phase. *Histochem Cell Biol* **141**: 137–152.

Lermontova I, Schubert V, Bornke F, Macas J, Schubert I. 2007. Arabidopsis CBF5 interacts with the H/ACA snoRNP assembly factor NAF1. *Plant Mol Biol* **65**: 615–626.

Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW-L, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE. 2006. An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell* **126**: 93–106.

Li L, Lyu X, Hou C, Takenaka N, Nguyen HQ, Ong C-T, Cubenas-Potts C, Hu M, Lei EP, Bosco G, et al. 2015. Widespread rearrangement of 3D chromatin organization underlies polycomb-mediated stress-induced silencing. *Mol Cell* **58**: 216–231.

Liu Y, Liu Q, Yan Q, Shi L, Fang Y. 2014. Nucleolus-tethering system (NoTS) reveals that assembly of photobodies follows a self-organization model. *Mol Biol Cell* **25**: 1366–1373.

Lopez-Maury L, Marguerat S, Bahler J. 2008. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* **9**: 583–593.

Loss-Morais G, Waterhouse PM, Margis R. 2013. Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biol Direct* **8**: 6.

Luger K, Richmond TJ. 1998. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 33–40.

Mahata B, Sundqvist A, Xirodimas DP. 2012. Recruitment of RPL11 at promoter sites of p53-regulated genes upon nucleolar stress through NEDD8 and in an Mdm2-dependent manner. *Oncogene* **31**: 3060–3071.

Mais C, Wright JE, Prieto J-L, Raggett SL, McStay B. 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* **19**: 50–64.

Mao YS, Zhang B, Spector DL. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet TIG* **27**: 295–306.

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

Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJM. 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 367–376.

McClintock B. 1934. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. *Zeit Zellforsch Mik Anat* **21**: 294–328.

McStay B, Grummt I. 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 131–157.

Meister P, Taddei A. 2013. Building silent compartments at the nuclear periphery: a recurrent theme. *Curr Opin Genet Dev* **23**: 96–103.

Michniewicz M, Frick EM, Strader LC. 2015. Gateway-compatible tissue-specific vectors for plant

transformation. *BMC Res Notes* **8**: 63.

Moore HM, Bai B, Boisvert F-M, Latonen L, Rantanen V, Simpson JC, Pepperkok R, Lamond AI, Laiho M. 2011. Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics MCP* **10**: M111.009241.

Moore I, Samalova M, Kurup S. 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J Cell Mol Biol* **45**: 651–683.

Mosgoeller W. Nucleolar Ultrastructure in Vertebrates. In *In The Nucleolus*, pp. 10–20, Olson M,O,J, New York.

Mozgova I, Mokros P, Fajkus J. 2010. Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 2768–2780.

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J. 2009. Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18843–18848.

Nemeth A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, Peterfia B, Solovei I, Cremer T, Dopazo J, Langst G. 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet* **6**: e1000889.

Nemeth A, Langst G. 2011. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet TIG* **27**: 149–156.

Ochs R, Lischwe M, O'Leary P, Busch H. 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp Cell Res* **146**: 139–149.

Ochs RL, Lischwe MA, Shen E, Carroll RE, Busch H. 1985. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* **92**: 330–336.

Padeken J, Mendiburo MJ, Chlamydas S, Schwarz H-J, Kremmer E, Heun P. 2013. The nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol Cell* **50**: 236–249.

Papantonis A, Cook PR. 2013. Transcription factories: genome organization and gene regulation. *Chem Rev* **113**: 8683–8705.

Paredes S, Branco AT, Hartl DL, Maggert KA, Lemos B. 2011. Ribosomal DNA deletions modulate genome-wide gene expression: "rDNA-sensitive" genes and natural variation. *PLoS Genet* **7**: e1001376.

Paredes S, Maggert KA. 2009. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17829–17834.

Parry G. 2014. Components of the Arabidopsis nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth. *J Exp Bot* **65**: 6057–6067.

Pecinka A, Schubert V, Meister A, Kreth G, Klatte M, Lysak MA, Fuchs J, Schubert I. 2004. Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of Arabidopsis thaliana are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
Pederson T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.

Pendle AF, Clark GP, Boon R, Lewandowska D, Lam YW, Andersen J, Mann M, Lamond AI, Brown

JWS, Shaw PJ. 2005. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol Biol Cell* **16**: 260–269.

Phizicky EM, Hopper AK. 2010. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev* **24**: 1832–1860.

Pikaard CS, Mittelsten Scheid O. 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a019315.

Pollex T, Heard E. 2012. Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Curr Opin Cell Biol* **24**: 825–832.

Pombo A, Dillon N. 2015. Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 245–257.

Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen SE, Pikaard CS. 2006. The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* **126**: 79–92.

Pontes O, Pikaard CS. 2008. siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 197–203.

Pontes O, Vitins A, Ream TS, Hong E, Pikaard CS, Costa-Nunes P. 2013. Intersection of small RNA pathways in Arabidopsis thaliana sub-nuclear domains. *PloS One* **8**: e65652.

Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ, et al. 2010a. Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **6**: e1001225.

Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD, Pikaard CS. 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes Dev* **26**: 945–957.

Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Mozgova I, Hassel C, Pontes OMF, Tucker S, Mokros P, Muchova V, Fajkus J, et al. 2013. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes Dev* **27**: 1545–1550.

Pontvianne F, Blevins T, Pikaard CS. 2010b. Arabidopsis Histone Lysine Methyltransferases. *Adv Bot Res* **53**: 1–22.

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

Pratt-Hyatt M, Pai DA, Haeusler RA, Wozniak GG, Good PD, Miller EL, McLeod IX, Yates JR 3rd, Hopper AK, Engelke DR. 2013. Mod5 protein binds to tRNA gene complexes and affects local transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E3081–3089.

Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrence RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JC, Baulcombe DC, Viegas W, et al. 2008. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* **32**: 673–684.

Preuss S, Pikaard CS. 2007. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta* **1769**: 383–392.

Prieto J-L, McStay B. 2007. Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev* **21**: 2041–2054.

Quintana C, Bellefqih S, Laval JY, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Avila J, Ferrer I, Arranz R, Patino C. 2006. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J Struct Biol* **153**: 42–54.

Rajamaki M-L, Valkonen JPT. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in Nicotiana species. *Plant Cell* **21**: 2485–2502.

Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* **255**: 177–235.

Risueno MC, Medina FJ. 1986. The nucleolar structure in plant cells. *Revis Sobre Biol Cel RBC* **7**: 1–154.

RITOSSA FM, SPIEGELMAN S. 1965. LOCALIZATION OF DNA COMPLEMENTARY TO RIBOSOMAL RNA IN THE NUCLEOLUS ORGANIZER REGION OF DROSOPHILA MELANOGASTER. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**: 737–745.

Rosa S, De Lucia F, Mylne JS, Zhu D, Ohmido N, Pendle A, Kato N, Shaw P, Dean C. 2013. Physical clustering of FLC alleles during Polycomb-mediated epigenetic silencing in vernalization. *Genes Dev* **27**: 1845–1850.

Roschzttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S. 2009. Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol* **151**: 1329–1338.

Roschzttardtz H, Grillet L, Isaure M-P, Conejero G, Ortega R, Curie C, Mari S. 2011. Plant cell nucleolus as a hot spot for iron. *J Biol Chem* **286**: 27863–27866.

Roudier F, Ahmed I, Berard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, et al. 2011. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J* **30**: 1928–1938.

Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N, Eaton ML, Landolin JM, Bristow CA, Ma L, Lin MF, et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. *Science* **330**: 1787–1797.

Ruckova E, Friml J, Prochazkova Schrumpfova P, Fajkus J. 2008. Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Mol Biol* **66**: 637–646.

Saad H, Gallardo F, Dalvai M, Tanguy-le-Gac N, Lane D, Bystricky K. 2014. DNA dynamics during early double-strand break processing revealed by non-intrusive imaging of living cells. *PLoS Genet* **10**: e1004187.

Saez-Vasquez J, Caparros-Ruiz D, Barneche F, Echeverria M. 2004. A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol* **24**: 7284–7297.

Sakamoto K, Nagatani A. 1996. Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J Cell Mol Biol* **10**: 859–868.

Samaha H, Delorme V, Pontvianne F, Cooke R, Delalande F, Van Dorsselaer A, Echeverria M, Saez-Vasquez J. 2010. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a Brassica oleracea RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant J Cell Mol Biol* **61**: 383–398.

Sanford JR, Caceres JF. 2004. Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *J Cell Sci* **117**: 6261–6263.

Schena M, Lloyd AM, Davis RW. 1991. A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10421–10425.

Schneider C, Tollervey D. 2013. Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* **38**: 485–493.

Schroder JM. 2005. Ferritinopathy: diagnosis by muscle or nerve biopsy, with a note on other nuclear inclusion body diseases. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**: 109–114.

Schrumpfova PP, Vychodilova I, Dvorackova M, Majerska J, Dokladal L, Schorova S, Fajkus J. 2014. Telomere repeat binding proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase. *Plant J Cell Mol Biol* **77**: 770–781.

Schubert V, Berr A, Meister A. 2012. Interphase chromatin organisation in Arabidopsis nuclei: constraints versus randomness. *Chromosoma* **121**: 369–387.

Schubert V, Weisshart K. 2015. Abundance and distribution of RNA polymerase II in Arabidopsis interphase nuclei. *J Exp Bot* **66**: 1687–1698.

Schuler M, Bauer P. 2011. Heavy Metals Need Assistance: The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the Arabidopsis NAS Gene Family. *Front Plant Sci* **2**: 69.

Scott MS, Boisvert F-M, Lamond AI, Barton GJ. 2011. PNAC: a protein nucleolar association classifier. *BMC Genomics* **12**: 74.

Sequeira-Mendes J, Araguez I, Peiro R, Mendez-Giraldez R, Zhang X, Jacobsen SE, Bastolla U, Gutierrez C. 2014. The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* **26**: 2351–2366.

Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2015. Genome architecture: from linear organisation of chromatin to the 3D assembly in the nucleus. *Chromosoma*.

Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies F, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. 2012. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* **148**: 458–472.

Shaw PJ, Jordan EG. 1995. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 93–121.

Sikorski PJ, Zuber H, Philippe L, Sement FM, Canaday J, Kufel J, Gagliardi D, Lange H. 2015. Distinct 18S rRNA precursors are targets of the exosome complex, the exoribonuclease RRP6L2 and the terminal nucleotidyltransferase TRL in Arabidopsis thaliana. *Plant J Cell Mol Biol* **83**: 991–1004.

Sleeman JE, Ajuh P, Lamond AI. 2001. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci* **114**: 4407–4419.

Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 555–590.

Spector DL, Lamond AI. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**. pii: a000646

Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6**: 782–792.

Stavreva DA, Kawasaki M, Dundr M, Koberna K, Muller WG, Tsujimura-Takahashi T, Komatsu W, Hayano T, Isobe T, Raska I, et al. 2006. Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* **26**: 5131–5145.

Stepinski D. 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* **251**: 1285–1306.

Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE. 2013. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* **152**: 352–364.

Sullivan AM, Arsovski AA, Lempe J, Bubb KL, Weirauch MT, Sabo PJ, Sandstrom R, Thurman RE, Neph S, Reynolds AP, et al. 2014. Mapping and dynamics of regulatory DNA and transcription factor networks in A. thaliana. *Cell Rep* **8**: 2015–2030.

Taddei A, Van Houwe G, Hediger F, Kalck V, Cubizolles F, Schober H, Gasser SM. 2006. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* **441**: 774–778.

Taliansky ME, Brown JWS, Rajamaki ML, Valkonen JPT, Kalinina NO. 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* **77**: 119–158.

Tamura K, Fukao Y, Iwamoto M, Haraguchi T, Hara-Nishimura I. 2010. Identification and characterization of nuclear pore complex components in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 4084–4097.

Tatout C, Evans DE, Vanrobays E, Probst AV, Graumann K. 2014. The plant LINC complex at the nuclear envelope. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* **22**: 241–252.
ten Hove CA, Lu K-J, Weijers D. 2015. Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Dev Camb Engl* **142**: 420–430.

Tessadori F, Schulkes RK, van Driel R, Fransz P. 2007. Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J Cell Mol Biol* **50**: 848–857.

Tessadori F, van Zanten M, Pavlova P, Clifton R, Pontvianne F, Snoek LB, Millenaar FF, Schulkes RK, van Driel R, Voesenek LACJ, et al. 2009. Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **5**: e1000638.

Thiry M, Lafontaine DLJ. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* **15**: 194–199.

Thompson M, Haeusler RA, Good PD, Engelke DR. 2003. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**: 1399–1401.

Tomecki R, Dziembowski A. 2010. Novel endoribonucleases as central players in various

pathways of eukaryotic RNA metabolism. *RNA N Y N* **16**: 1692–1724.

Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. 2006. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* **17**: 955–965.

Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 351–356.

Van Buskirk EK, Decker PV, Chen M. 2012. Photobodies in light signaling. *Plant Physiol* **158**: 52–60.

van Koningsbruggen S, Gierlinski M, Schofield P, Martin D, Barton GJ, Ariyurek Y, den Dunnen JT, Lamond AI. 2010. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell* **21**: 3735–3748.

van Zanten M, Koini MA, Geyer R, Liu Y, Brambilla V, Bartels D, Koornneef M, Fransz P, Soppe WJJ. 2011. Seed maturation in Arabidopsis thaliana is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 20219–20224.

van Zanten M, Tessadori F, Peeters AJM, Fransz P. 2012. Shedding light on large-scale chromatin reorganization in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **5**: 583–590.

Vespa L, Warrington RT, Mokros P, Siroky J, Shippen DE. 2007. ATM regulates the length of individual telomere tracts in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18145–18150.

Wachtler F, Ellinger A, Schwarzacher HG. 1980. Nucleolar changes in human phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Cell Tissue Res* **213**: 351–360.

Wachtler F, Roubicek C, Schedle A, Mosgoller W, Bretis G, Schwarzacher HG. 1990. Nucleolus organizer regions in human lymphocytes as studied with premature chromosome condensation. *Hum Genet* **84**: 244–248.

Wang C, Liu C, Roqueiro D, Grimm D, Schwab R, Becker C, Lanz C, Weigel D. 2015. Genome-wide analysis of local chromatin packing in Arabidopsis thaliana. *Genome Res* **25**: 246–256.

Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, et al. 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids. *Genetics* **172**: 507–517.

Wang L, Haeusler RA, Good PD, Thompson M, Nagar S, Engelke DR. 2005. Silencing near tRNA genes requires nucleolar localization. *J Biol Chem* **280**: 8637–8639.

Wang L, Ren X, Xing J, Zheng AC. 2010. The nucleolus and viral infection. *Virol Sin* **25**: 151–157.

Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Peng W, Zhang MQ, et al. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**: 897–903.

Warner JR, Soeiro R. 1967. Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 1984–1990.

Watkins NJ, Bohnsack MT. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**: 397–414.

Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A. 1999. Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol* **145**: 437–445.

Zachova D, Fojtova M, Dvorackova M, Mozgova I, Lermontova I, Peska V, Schubert I, Fajkus J, Sykorova E. 2013. Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in Arabidopsis. *Physiol Plant* **149**: 114–126.

Zhao ZW, Roy R, Gebhardt JCM, Suter DM, Chapman AR, Xie XS. 2014. Spatial organization of RNA polymerase II inside a mammalian cell nucleus revealed by reflected light-sheet superresolution microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 681–686.

IX. Annexes

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in *Arabidopsis*

Frédéric Pontvianne,[1,2,7] Todd Blevins,[1,2] Chinmayi Chandrasekhara,[1,2] Wei Feng,[1] Hume Stroud,[3] Steven E. Jacobsen,[3,4,5] Scott D. Michaels,[1] and Craig S. Pikaard[1,2,6,8]

[1]Department of Biology, [2]Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA; [3]Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, [4]Howard Hughes Medical Institute, [5]Molecular Biology Institute, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California 90095, USA; [6]Howard Hughes Medical Institute, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA

Eukaryotes have hundreds of nearly identical 45S ribosomal RNA (rRNA) genes, each encoding the 18S, 5.8S, and 25S catalytic rRNAs. Because cellular demands for ribosomes and protein synthesis vary during development, the number of active rRNA genes is subject to dosage control. In genetic hybrids, one manifestation of dosage control is nucleolar dominance, an epigenetic phenomenon in which the rRNA genes of one progenitor are repressed. For instance, in *Arabidopsis suecica*, the allotetraploid hybrid of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis arenosa*, the *A. thaliana*-derived rRNA genes are selectively silenced. An analogous phenomenon occurs in nonhybrid *A. thaliana*, in which specific classes of rRNA gene variants are inactivated. An RNA-mediated knockdown screen identified SUVR4 {SUPPRESSOR OF VARIEGATION 3-9 [SU(VAR)3-9]-RELATED 4} as a histone H3 Lys 9 (H3K9) methyltransferase required for nucleolar dominance in *A. suecica*. H3K9 methyltransferases are also required for variant-specific silencing in *A. thaliana*, but SUVH5 [SU(VAR)3-9 HOMOLOG 5] and SUVH6, rather than SUVR4, are the key activities in this genomic context. Mutations disrupting the H3K27 methyltransferases ATXR5 or ATXR6 affect which rRNA gene variants are expressed or silenced, and in *atxr5 atxr6* double mutants, dominance relationships among variants are reversed relative to wild type. Interestingly, these changes in gene expression are accompanied by changes in the relative abundance of the rRNA gene variants at the DNA level, including overreplication of the normally silenced class and decreased abundance of the normally dominant class. Collectively, our results indicate that histone methylation can affect both the doses of different variants and their differential silencing through the choice mechanisms that achieve dosage control.

[*Keywords*: DNA methylation; chromatin modification; epigenetic; gene expression; histone methylation; nucleolar dominance; transcription]

Supplemental material is available for this article.

Received November 7, 2011; revised version accepted March 21, 2012.

In eukaryotes, 45S ribosomal RNA (rRNA) genes are tandemly repeated at chromosomal loci known as nucleolus organizer regions (NORs) (Long and Dawid 1980; Haaf et al. 1991; Raska et al. 2006; Saez-Vasquez and Echeverria 2007). Each rRNA gene has the potential to be transcribed by RNA polymerase I (Pol I) to produce a 45S pre-rRNA transcript that is then processed into the 18S, 5.8S, and 25S rRNAs present at the catalytic core of ribosomes, the cellular machines that carry out protein synthesis (Granneman and Baserga 2005; Moss et al. 2007; Kressler et al. 2010). Of the hundreds (sometimes thousands) of rRNA genes present in eukaryotic genomes, only a subset is transcribed by Pol I in most cells, with changes in DNA methylation and post-translational histone modifications affecting rRNA gene "on" or "off" states in both mammals and plants (Grummt and Pikaard 2003; Lawrence and Pikaard 2004; Grummt 2007; McStay and Grummt 2008; McKeown and Shaw 2009)

Nucleolar dominance is a phenomenon that occurs in interspecific hybrids and describes the epigenetic silencing of the rRNA genes contributed by one of the progenitors (McStay 2006; Tucker et al. 2010). First described in plants, nucleolar dominance also occurs in hybrids of insects, invertebrates, amphibians, and mammals (Pikaard 2000). In *Arabidopsis suecica*, the allotetraploid

[7]**Present address: Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535, CNRS, 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier, France.**
[8]**Corresponding author.**
E-mail cpikaard@indiana.edu.
Article is online at http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.182865.111. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

hybrid of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis arenosa*, the *A. thaliana*-derived rRNA genes are selectively silenced during early vegetative development such that only *A. arenosa*-derived rRNA genes are expressed in leaves of mature plants (Fig. 1A; Chen et al. 1998; Pontes et al. 2007). Initial studies with chemical inhibitors showed that rRNA gene silencing in nucleolar dominance involves concerted changes in DNA methylation and histone modification (Chen and Pikaard 1997; Lawrence et al. 2004). Subsequent RNAi-mediated knockdown screens have identified histone deacetylase 6 (HDA6), methylcytosine-binding domain protein 6 (MBD6), MBD10, the de novo DNA methyltransferase DRM2, and proteins of the siRNA-directed DNA methylation pathway as activities required for nucleolar dominance in *A. suecica* (Earley et al. 2006a; Preuss et al. 2008).

A nucleolar dominance-like phenomenon also occurs in nonhybrid *A. thaliana*, in which distinct rRNA gene variants are selectively inactivated during early vegetative development, following a time course similar to the silencing of *A. thaliana*-derived rRNA genes in *A. suecica* (Earley et al. 2010; Abou-Ellail et al. 2011). Variant-specific rRNA gene silencing in *A. thaliana* involves HDA6 (Earley et al. 2010), as in *A. suecica*, as well as nucleolin (AtNUCL1), a protein implicated in multiple aspects of rRNA gene expression and rRNA processing (Ginisty et al. 1999; Mongelard and Bouvet 2007; Pontvianne et al. 2007, 2010a). The involvement of HDA6 in rRNA gene silencing in both *A. suecica* and *A. thaliana* suggests that rRNA gene silencing mechanisms in hybrids and nonhybrids might be fundamentally similar.

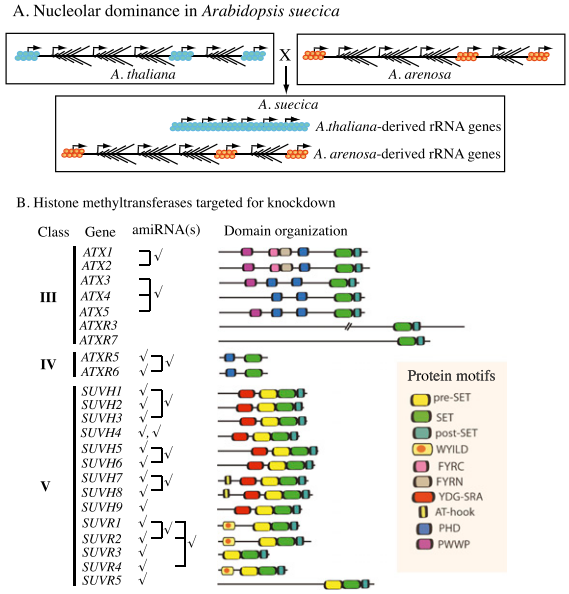


Figure 1. Nucleolar dominance and HKMTs in *Arabidopsis*. (*A*) Cartoon depicting the selective epigenetic silencing of *A. thaliana*-derived rRNA genes in *A. suecica*, the allotetraploid hybrid of *A. thaliana* and *A. arenosa*. (*B*) Putative HKMTs in *Arabidopsis*, and amiRNA constructs designed to target the corresponding HKMT mRNAs (check marks). Brackets indicate instances where a single amiRNA targeted multiple mRNAs. Domain organizations of the HKMT proteins are depicted in the diagrams to the *right*.

Histone lysine methyltransferases (HKMTs) play important roles in eukaryotic gene regulation and chromatin organization. Depending on the lysine that is modified, HKMT activities can repress or activate transcription (Lachner and Jenuwein 2002; Bell et al. 2011). For example, dimethylation of histone H3 on Lys 9 (H3K9me2) is a mark typical of inactive heterochromatin. Accordingly, silent *A. thaliana*-derived rRNA genes in hybrid *A. suecica* are associated with nucleosomes enriched for H3K9me2. Conversely, the dominant *A. arenosa*-derived rRNA genes in *A. suecica* are preferentially associated with H3 that is trimethylated on Lys 4 (H3K4me3), a hallmark of active genes (Lawrence et al. 2004; Earley et al. 2006a). In *hda6* mutants of *A. thaliana*, in which selective silencing of rRNA gene variants fails to occur during development, reduced association of rRNA genes with H3K9me2 and increased H3K4me3 association is observed (Earley et al. 2010). Therefore, H3K9me2 enrichment correlates with gene silencing in both hybrid and nonhybrid *Arabidopsis*, but the identities of the H3K9 methyltransferases involved are unknown.

The catalytic activity of lysine methyltransferases resides in their SET domains, named for the founding members of the family: the *Drosophila* proteins Suppressor of Variegation 3-9 [Su(var)3-9], Enhancer of Zeste, and Trithorax (Rea et al. 2000). In *Arabidopsis*, 49 genes encode proteins with a SET domain, 30 of which are homologous to enzymes known to methylate the N-terminal tails of histones (Pontvianne et al. 2010b). Among these are a class of 14 enzymes {class V; SUVH1–9 [SU(VAR)3-9 HOMOLOG 1–9] and SUVR1–5 [SU(VAR)3-9-RELATED 1–5]} whose known or predicted substrates are H3K9 (Fig. 1B; Baumbusch et al. 2001; Pontvianne et al. 2010b). SUVH proteins are distinguishable from SUVR proteins by the presence of a RING finger-associated (SRA) domain in addition to a SET domain. The SRA domain binds methylated DNA, thereby linking DNA methylation to H3K9 methylation in order to reinforce the silent epigenetic state (Fig. 1B; Johnson et al. 2007; Law and Jacobsen 2010; Rajakumara et al. 2011). Mutations in the SRA domain can disrupt gene silencing, indicating that the domain is essential for SUVH function (Johnson et al. 2007, 2008; Rajakumara et al. 2011).

SUVH4/KRYPTONITE (KYP) is thought to be the major H3K9 methyltransferase enzyme in *Arabidopsis* (Jackson et al. 2002; Johnson et al. 2002; Malagnac et al. 2002; Jasencakova et al. 2003). However, SUVH5 and SUVH6 act redundantly with SUVH4 to silence transcription at some loci (Ebbs et al. 2005; Ebbs and Bender 2006). SUVR4 catalyzes di- and trimethylation of H3K9 in vitro and is implicated in transposon silencing (Thorstensen et al. 2006; Veiseth et al. 2011). SUVR5 plays a role in flowering time regulation (Krichevsky et al. 2007).

Histone H3 can be monomethylated on Lys 27 (H3K27me1) by ATXR5 and ATXR6 in *Arabidopsis*, and this modification plays an important role in gene silencing and genome stability (Jacob et al. 2009). In *atxr5 atxr6* (*atxr5/6*) double mutants, repetitive elements that are

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

normally silenced are derepressed without affecting H3K9 methylation or DNA methylation, demonstrating that H3K27me1 is a critical modification for silencing these elements. Moreover, mutations disrupting ATXR5 and ATXR6 activity cause the overreplication of heterochromatic regions enriched for silenced repetitive elements, implicating the H3K27me1 chromatin mark in the negative control of origin of replication activity (Jacob et al. 2010).

In this study, we sought to identify specific histone methyltransferases that regulate the number of actively transcribed rRNA genes in the allopolyploid hybrid *A. suecica* and in diploid, nonhybrid *A. thaliana*. We demonstrate that rRNA gene silencing is mediated by distinct H3K9 methyltransferases in these two genomic contexts. Moreover, we show that the H3K27me1 methyltransferases ATXR5 and AXTR6 influence variant-specific rRNA gene expression patterns in diploid *A. thaliana*, both by affecting the relative copy number (dose) of variants and by separable effects on the dosage control system.

Results

SUVR4 is required for nucleolar dominance in A. suecica

We conducted a systematic screen of *Arabidopsis* H3K9 methyltransferases involved in nucleolar dominance in *A. suecica* by expressing transgenes encoding artificial microRNAs (amiRNAs) (Schwab et al. 2006) that target the mRNAs of class V (SUVH and SUVR) enzymes. Some amiRNAs were designed to knock down mRNAs of as many as three closely related genes, and others targeted individual mRNAs (Fig. 1B).

In *A. suecica*, pre-rRNA transcripts from the *A. arenosa*- and *A. thaliana*-derived rRNA genes can be discriminated from one another using an RT-CAPS (reverse transcription-cleaved amplified polymorphic sequence) assay (Lewis and Pikaard 2001). This PCR-based assay exploits a single-nucleotide polymorphism that generates an additional Hha I restriction endonuclease site within the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *A. arenosa* rRNA genes, relative to *A. thaliana* rRNA genes, such that Hha I digestion allows *A. thaliana* and *A. arenosa* genes or their transcripts to be discriminated from one another (Fig. 2A).

RT-CAPS assays were performed using RNA isolated from six or more independent transgenic individuals for each of the 22 different amiRNAs that were expressed in transgenic *A. suecica* plants. Nucleolar dominance was unaffected by the majority of amiRNA constructs. However, an amiRNA that concurrently targeted mRNAs of *SUVR1, SUVR2*, and *SUVR4*, the most closely related genes within the *SUVR* subfamily, disrupted silencing of *A. thaliana* rRNA genes in multiple transformants (Supplemental Fig. S1A,B), similar to a previously characterized RNAi line (Preuss et al. 2008) that knocks down the de novo DNA methyltransferase *DRM2*.

We next engineered and expressed amiRNAs targeting *SUVR1*, *SUVR2*, or *SUVR4* individually and tested eight primary transformants (T1 plants) for each construct by both RT-CAPS and quantitative PCR to see whether silencing of *A. thaliana*-derived rRNA genes was disrupted. Significant expression of *A. thaliana*-derived pre-rRNA was detected in plants expressing the amiRNA targeting *SUVR4* compared with nontransformed *A. suecica* (Fig. 2B; Supplemental Fig. S3). In these lines, *SUVR4* mRNA levels are reduced relative to the nontransformed plants (Fig. 2C), but nontargeted mRNAs, including *SUVR1*, *SUVR2*, *SUVH4*, *SUVH5*, and *SUVH6* mRNAs, are unaffected, demonstrating the specificity of the *SUVR4* amiRNA (Supplemental Fig. S1C). Likewise, amiRNAs targeting SUVH4, SUVH5, and/or SUVH6 mRNAs knocked down their targets several-fold (Supplemental Fig. S2A,B). However, no disruption of nucleolar dominance occurred in SUVH4, SUVH5, or SUVH6 knockdown lines (Supplemental Fig. S2C–E).

The disruption of nucleolar dominance observed in *SUVR4* amiRNA T1 plants (Fig. 2B) persisted in the T2 generation, as shown using RT-CAPS and S1 nuclease protection using a probe specific for *A. thaliana* rRNA gene transcripts that are accurately initiated at the gene promoter (Fig. 2C,D). Approximately half of the plants expressing the amiRNA that targets only *SUVR1* showed some loss of nucleolar dominance (Supplemental Fig. S1B), suggesting that SUVR1 may also participate in rRNA gene silencing. However, the lower frequency of an effect compared with *SUVR4* knockdown lines suggests that SUVR1 may be less critical than SUVR4 for nucleolar dominance.

To determine whether *SUVR4* knockdown affects H3K9 methylation at rRNA genes, chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed using antibodies specific for dimethylated H3K9 (H3K9me2). A significant decrease in H3K9me2 associated with both *A. thaliana*- and *A. arenosa*-derived rRNA genes was detected in *SUVR4* amiRNA plants (line A) compared with wild-type *A. suecica* plants (Fig. 2E). This change in H3K9me2 levels at both progenitors' rRNA genes is consistent with prior studies that indicated that dosage control of the dominant set of rRNA genes (*A. arenosa*) involves the same chromatin modifications responsible for the nearly complete silencing of the underdominant set of genes (Lawrence et al. 2004). For instance, the failure to silence underdominant rRNA genes upon treatment of plants with 5-aza-deoxycytosine, a cytosine methylation inhibitor, or trichostatin A, a HDA inhibitor, is accompanied by the up-regulation of the dominant rRNA genes (Lawrence et al. 2004).

SUVH5 and SUVH6, but not SUVR4, regulate rRNA gene expression in A. thaliana

We next asked whether H3K9 methyltransferases involved in uniparental rRNA gene silencing in allotetraploid hybrids mediate the silencing of specific rRNA gene variants in nonhybrid diploids. Previous work showed that a class of "long" rRNA gene variants, representing ~50% of the total rRNA gene pool in *A. thaliana* ecotype Col-0, is transcriptionally inactivated in mature leaves (Earley et al. 2010; Pontvianne et al. 2010a; Abou-Ellail et al. 2011). The presence or absence of an 81-base-pair (bp) insertion at the 3′ end of the pre-rRNA transcripts distin-

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

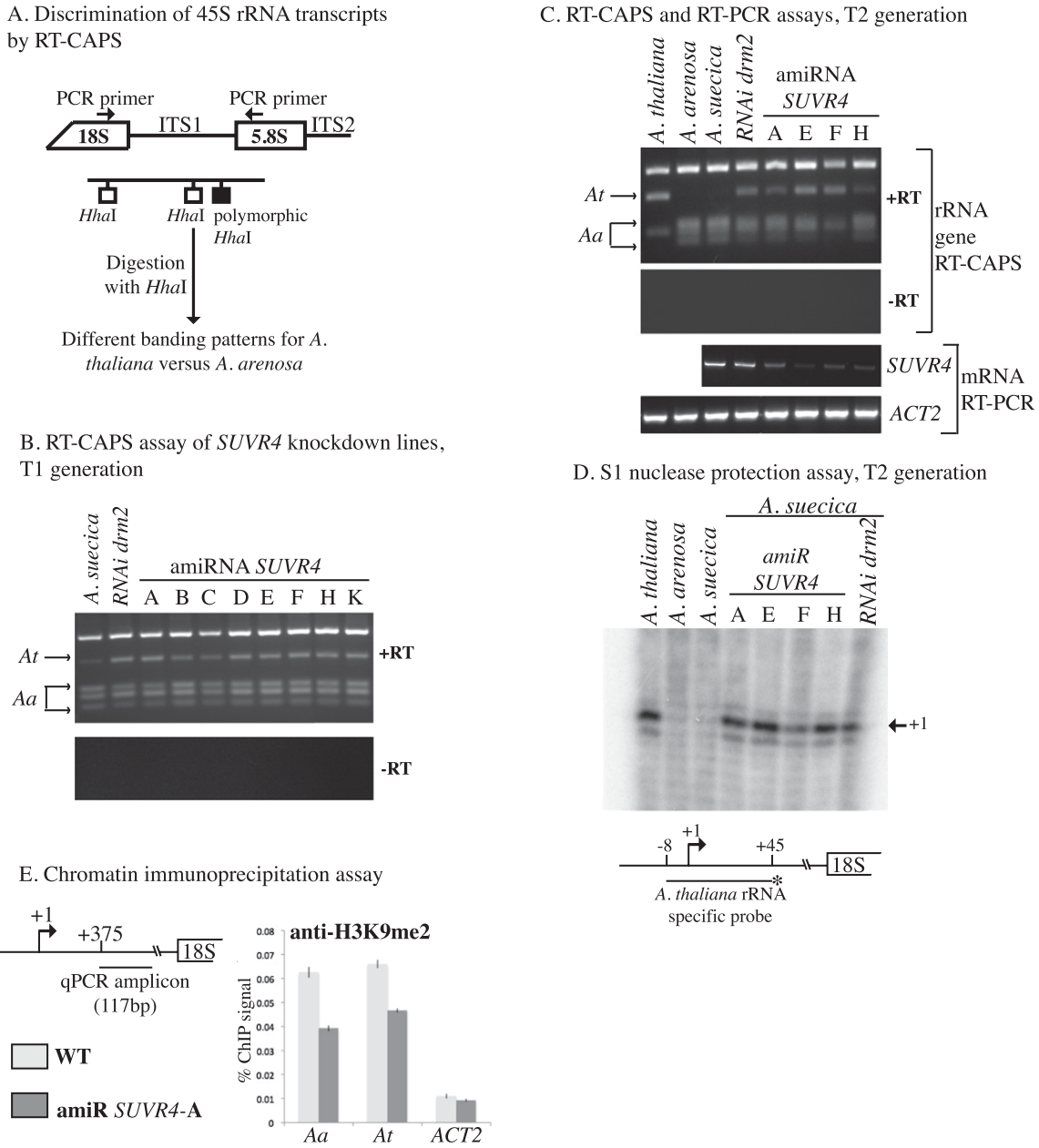


Figure 2. SUVR4 is implicated in nucleolar dominance. (*A*). Diagram outlining the CAPS assay that distinguishes the *A. arenosa*- or *A. thaliana*-derived rRNA genes or their transcripts in *A. suecica*. (*B*) RT-CAPS analysis of rRNA gene variant expression in *SUVR4* knockdown lines (T1 generation), nontransgenic *A. suecica* (negative control), or a *DRM2* RNAi knockdown line (positive control). Control reactions in which reverse transcriptase was omitted (−RT) are also shown. (*C*) Persistence of disrupted nucleolar dominance in T2 siblings of a *SUVR4* knockdown line. Also shown are *SUV4* mRNA levels in the knockdown lines relative to *A. suecica* and *DRM2*-RNAi controls. RT–PCR of actin (ACT2) served as a control, showing that equivalent amounts of RNA were assayed. (*D*) S1 nuclease protection assay following hybridization of total RNA with an end-labeled *A. thaliana*-specific ssDNA probe. Following S1 nuclease digestion, products were subjected to denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. (*E*) ChIP analysis of H3K9me2 levels in the region downstream from the transcription start site in wild-type *A. suecica* and *SUVR4* amiRNA plants. Quantitative PCR used TaqMan probes. *ACTIN2* served as a H3K9me2-depleted control.

guishes long variants from short variants such that expression of both variant types can be monitored by RT–PCR using primers that flank the insertion/deletion site (Fig. 3A). In leaves of mature wild-type plants (Col-0), only short variants are abundantly expressed. However, in *hda6* mutants, repression of long variant transcription is disrupted such that long and short variants are both expressed (Fig. 3A; Earley et al. 2010). Only short variant transcripts are detected in *suvr1*- or *suvr2*-null mutants or *suvr1 suvr2* (*suvr1/2*) double mutants. Likewise, knocking down *SUVR4* using amiRNAs or RNAi-inducing dsRNAs did not disrupt long variant repression (Fig. 3A, left panel), in

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

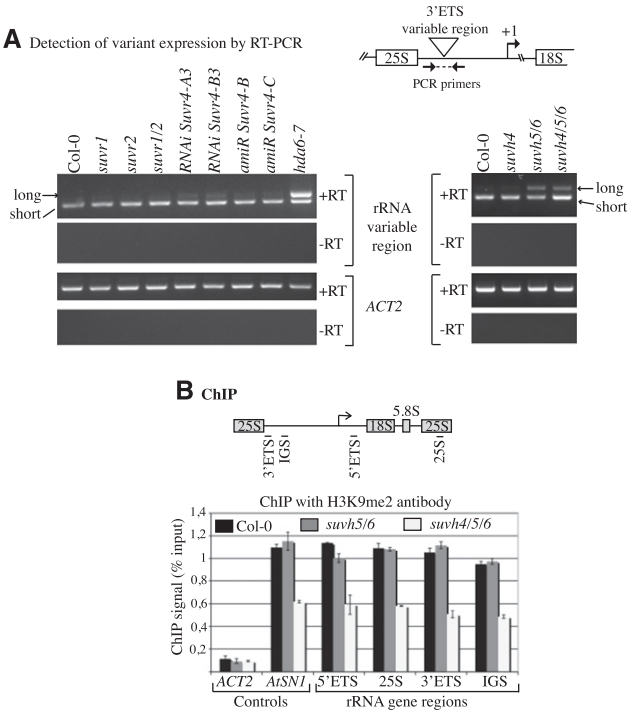


Figure 3. SUVH5 and SUVH6 contribute to long variant silencing in *A. thaliana*. (*A*) RT–PCR detection of long and short rRNA gene variant transcripts in wild type or *suvr* or *hda6* mutants (*left* panel) or *suvh* mutants (*right* panel). (*B*) H3K9me2 association with rRNA genes, measured by ChIP. The diagram depicts a 45S rRNA gene repeat and shows the regions that were queried by PCR following ChIP: 25S rRNA, 3′ ETS, 5′ ETS, or IGS. Actin (*ACT2*) and *AtSN1* retroelements served as controls for active, H3K9me2-depleted or silent, H3K9me2-enriched loci, respectively.

contrast to the disruption of nucleolar dominance that occurs upon *SUVR4* knockdown in *A. suecica* hybrids.

We next examined mutants ablating members of the *SUVH* subfamily of histone methyltransferases. No change in rRNA long variant expression was detected in *suvh4* single mutants, relative to wild-type plants, but long variant silencing is disrupted in *suvh5 suvh6* double mutants (*suvh5/6*) or *suvh4 suvh5 suvh6* triple mutants (*suvh4/5/6*) (Fig. 3A, right panel). Interestingly, short variant expression is elevated in *suvh4/5/6* triple mutants, relative to the *suvh5/6* double mutants or wild-type Col-0. These data suggest that SUVH5 and/or SUVH6 are important in the choice mechanism(s) responsible for selective silencing of long rRNA gene variants, with SUVH4 playing a role in regulating the total amount of gene expression from specific subsets of rRNA genes.

ChIP was employed to examine H3K9me2 at rRNA genes in wild-type Col-0, *suvh5/6*, and *suvh4/5/6* mutant plants (Fig. 3B). These ChIP data report on the chromatin states of both the long and short variants combined. Surprisingly, H3K9me2 was only found to be reduced within transcribed (5′ ETS [external transcribed sequence], 25S, and 3′ ETS) and intergenic spacer (IGS) regions in *suvh4/5/6* triple mutants, whereas no change from wild type was observed in the *suvh5/6* double mutant (Fig. 3B). These data indicate that SUVH4 mediates H3K9 dimethylation of rRNA genes, consistent with a role in modulating their expression levels, despite not being essential in the choice mechanisms that discriminate among gene variants.

Loss of CG methylation at rRNA genes in suvh5/6 *mutants*

We reported previously that long variant expression correlates with reduced CG and CHG methylation flanking the rRNA gene transcription initiation site (Earley et al. 2010; Pontvianne et al. 2010a). Using bisulfite treatment followed by DNA sequencing (Frommer et al. 1992), we analyzed the cytosine methylation status of rRNA gene promoter regions (positions −316 to +243 relative to the transcription start site, defined as +1) in wild-type plants and *suvh* mutants (Fig. 4A). Importantly, the sequences of all rRNA genes are identical in this region, such that variants cannot be discriminated within their promoter regions. Promoter region CG methylation is reduced ~20% in *suvh4* mutants and ~50% in *suvh5/6* double mutants or *suvh4/5/6* triple mutants relative to wild-type Col-0 (Fig. 4B). Changes in CG methylation are mainly restricted to a 150-bp region beginning 50 bp downstream from +1 within the transcribed region (Fig. 4C). No significant change in overall CHH methylation was detected in *suvh5/6* compared with Col-0, but CHG methylation was reduced in the double mutant, mostly within the transcribed region where CG methylation is also reduced (Fig. 4B,C). More dramatic reductions in CHG and CHH methylation were observed in *suvh4* and *suvh4/5/6* mutants (Fig. 4B,C) and are therefore attributable to *suvh4*. Because silencing of long rRNA gene variants is disrupted in *suvh5/6* but not *suvh4* mutants, we conclude that SUVH5 and SUVH6 are important for CG and CHG methylation in the transcribed region downstream from +1 and that decreased cytosine methylation in this region correlates with long variant expression.

A role for H3K27 monomethyltransferases ATXR5 and ATXR6 in rRNA gene regulation

To determine whether histone H3K27me1 plays a role in rRNA gene variant silencing, we analyzed long and short variant transcript accumulation by RT–PCR in *atxr5* or *atxr6* single mutants and *atxr5/6* double mutants, comparing them with wild type (Col-0) and *hda6* mutants (Fig. 5A). Unlike *hda6* mutants, in which long and short rRNA gene variants are both highly expressed, *atxr6* single mutants resemble wild-type plants in that the short variants remain dominant (Fig. 5A, top panels, RT–PCR analysis of subregion A). However, in *atxr5* single mutants, long variant transcripts become more abundant than short variant transcripts. Remarkably, in *atxr5/6* mutants, only long variants are expressed at high levels. In these double mutants, the once-dominant short variants are expressed in only trace amounts.

Short variants can be further subdivided into two subclasses, short-a and short-b, based on small insertions/deletions (indels) that occur downstream from the dupli-

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

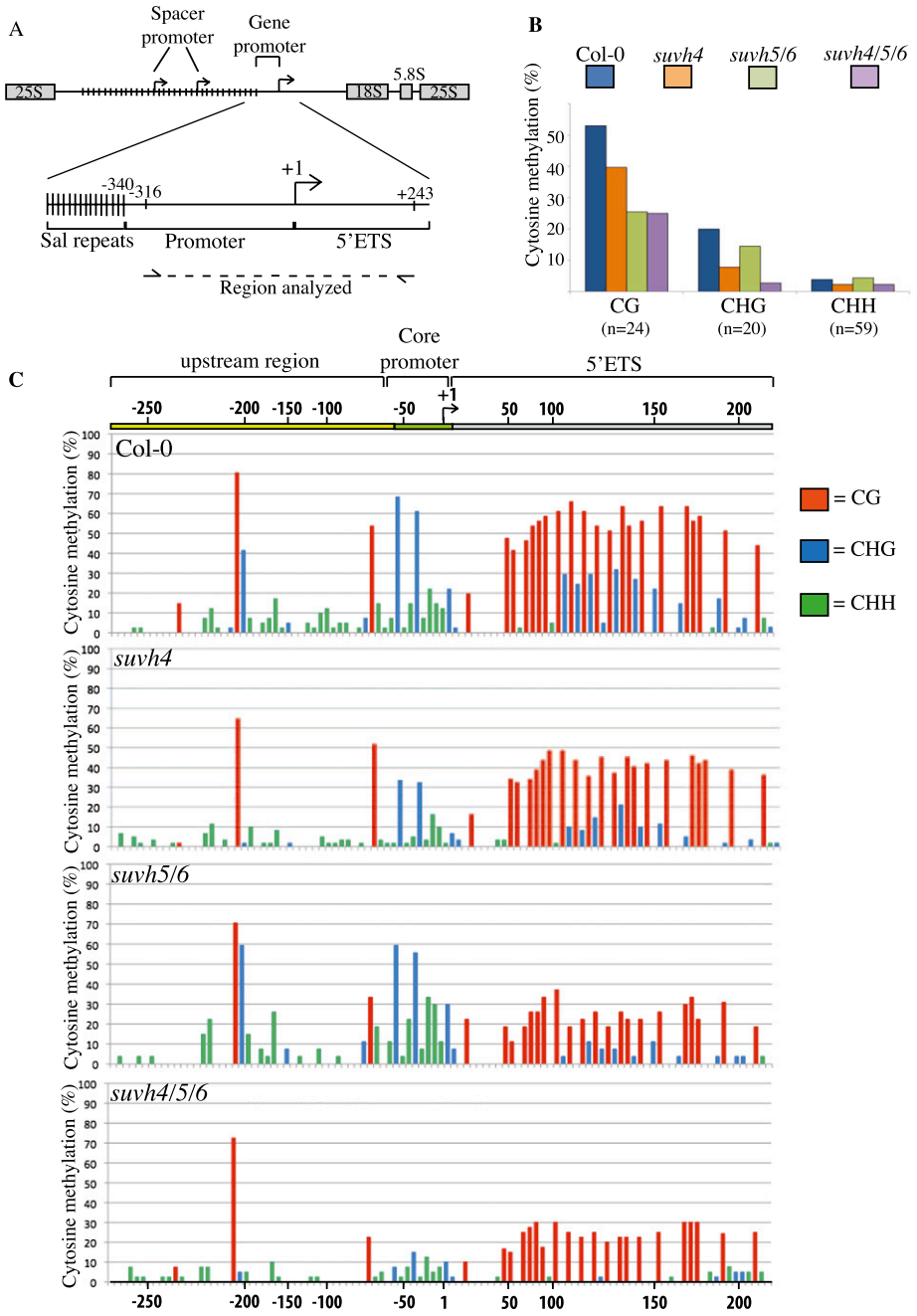


Figure 4. SUVH function affects rRNA gene cytosine methylation. (*A*) Diagram of the rRNA gene intergenic region highlighting the promoter region analyzed by bisulfite sequencing. (*B*) Histograms documenting the mean cytosine methylation levels at CG, CHG, or CHG motifs in wild type (Col-0) and *suvh4*, *suvh5/6*, and *suvh4/5/6* mutants based on sequencing of at least 30 independent clones following bisulfite treatment of genomic DNA. The number of CG, CHG, or CHH motifs per clone is indicated (*n*). (*C*) Positions of methylcytosines in the promoter region, displayed according to sequence context: CG (red), CHG (blue), and CHH (green). The height of each bar denotes the frequency at which that cytosine is methylated.

cated repeat that distinguishes long from short variants (see the diagram in Fig. 5A). PCR primers that amplify this larger region reveal additional complexity in the patterns of rRNA gene variant expression. In wild-type plants and *atxr6* single mutants, short-a transcripts are more abundant than short-b transcripts (Fig. 5A, RT–PCR analysis of subregion B). In *atxr5* mutants, long variants are now expressed, but the short-a and short-b transcripts are still detected in the same proportion as in wild-type plants. In *hda6* mutants, short-b transcripts become more abundant than short-a transcripts. The most dramatic change in rRNA gene variant expression occurs in *atxr5/6* double mutants in which short-a transcripts are undetectable and short-b variants are detected only in trace amounts

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

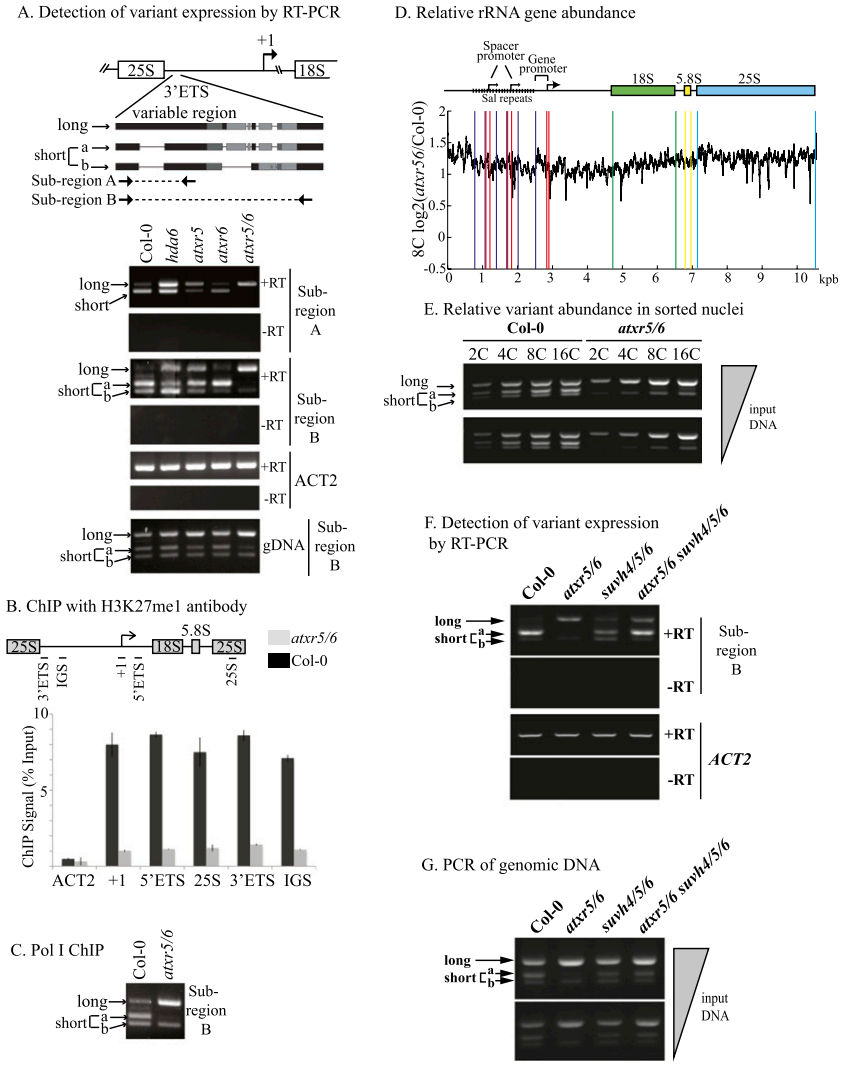


Figure 5. The H3K27 monomethylases ATXR5 and ATXR6 affect which rRNA gene variants are expressed or silenced. (*A*) The diagram depicts the polymorphic region in which long and short (a and b) rRNA gene variants differ due to indels. The panels *below* show RT–PCR analyses of rRNA gene variant expression in wild type (Col-0) or *hda6*, *atxr5*, *atxr6*, or *atxr5/6* mutants using PCR primers spanning two different polymorphic intervals (subregions A or B). The *ACT2* panel shows that equal amounts of RNA were subjected to RT–PCR for each genotype. Reactions in which reverse transcriptase was omitted (−RT) control for DNA contamination. The *bottom* panel shows PCR of genomic DNA (gDNA) using the primers that amplify subregion B. (*B*) H3K27me1 ChIP using chromatin isolated from 2-wk-old Col-0 or *atxr5/6* plants. Following ChIP, the indicated regions of the rRNA genes (or the *ACT2* control) were amplified and measured using quantitative PCR. (*C*) ChIP using an antibody recognizing the N-terminal domain of the RNA Pol I second-largest subunit, NRPA2. Following ChIP, polymorphic subregion B was amplified by PCR. (*D*) Relative rRNA gene copy number in *atxr5/6* double mutants relative to wild type (Col-0). The graph plots the log base 2 value for the ratio of normalized read counts for genomic DNA of 8C nuclei subjected to Illumina deep sequencing (Jacob et al. 2010). (*E*) Relative rRNA gene variant abundance in FACS-sorted nuclei of different ploidy (2C to 16C). Wild type (Col-0) and *atxr5/6* double mutants are compared. DNA was isolated from an equal number of nuclei for each ploidy level. PCR amplification of genomic DNA was conducted using primers specific for polymorphic subregion B. Reactions shown in the *top* panel were conducted using twice as much genomic DNA as in the *bottom* panel. Twofold increases in PCR products with each twofold increase in ploidy (and therefore DNA content) indicate that the amplification conditions are within the linear range. (*F*) RT–PCR analyses of rRNA gene variant expression patterns in wild type (Col-0), *atxr5/6* double mutants, *suvh4/5/6* triple mutants, or *atxr5/6 suvh4/5/6* quintuple mutants. The PCR primers amplify subregion B. *ACT2* and −RT controls are included. (*G*) Relative rRNA gene variant abundance in *atxr5/6* double mutants, *suvh4/5/6* triple mutants, or *atxr5/6 suvh4/5/6* quintuple mutants. Reactions shown in the *bottom* panel used one-half the genomic DNA used in the *top* panel, revealing that results are semiquantitative.

(Fig. 5A). Although the *atxr6* mutation alone has little effect on rRNA gene variant expression patterns, its synergistic effect when combined with the *atxr5* mutation suggests that ATXR5 and ATXR6 are partially redundant in their effects on the rRNA gene variant choice mechanism(s).

We used ChIP to determine whether histones bearing the H3K27me1 mark were depleted at rRNA genes in *atxr5/6* mutants (Fig. 5B; Supplemental Fig. S4). Indeed, consistent with ATXR5 and ATXR6 being the key enzymes for H3K27 monomethylation in *Arabidopsis*, H3K27me1 levels are very low throughout all regions of the rRNA genes in *atxr5/6* double mutants (Jacob et al. 2009).

We also performed ChIP using an antibody against the NRPA2 subunit of RNA Pol I to determine whether production of long, short-a, or short-b transcripts is consistent with transcription by Pol I within the polymorphic region that distinguishes these rRNA gene variant types (Fig. 5C). Comparison of wild type and *atxr5/6* double mutants shows that Pol I associates with the different variants within the polymorphic region in proportion to their relative expression levels (Fig. 5, cf. A and C, subregion B PCR results).

Remarkably, the absence of short-a transcripts in *atxr5/6* double mutants correlates with a substantial decrease in the abundance of the rRNA gene variants that encode these transcripts. This change at the DNA level is apparent upon PCR amplification of region B using genomic DNA as the template (Fig. 5A [bottom panel], E). Moreover, PCR analyses of genomic DNA indicate that the abundance of

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

long variants, relative to short variants, is increased in *atxr5* and *atxr5/6* mutants.

Jacob et al. (2010) showed that heterochromatic regions are overreplicated in *atxr5/6* mutants, providing a possible explanation for the changes in rRNA gene variant abundance that we observed upon PCR analysis of genomic DNA (see Fig. 5A, bottom panel). The overreplication of heterochromatin in *atxr5/6* mutants is most apparent in endopolyploid cells, which are common in *Arabidopsis* leaves. We therefore asked whether rRNA gene copy number, relative to other genomic sequences, is affected in *atxr5/6* mutants based on Illumina sequencing read counts (Jacob et al. 2010). Isolation of 8C nuclei (octaploid) from wild type and *atxr5/6* using fluorescence-activated cell sorting (FACS) followed by genome-wide deep sequencing revealed an approximately twofold increase in overall rRNA gene abundance in *atxr5/6* double mutants relative to wild-type Col-0 plants (Fig. 5D).

PCR amplification of rRNA gene variants was conducted using DNA isolated from equal numbers of FACS-sorted 2C (diploid), 4C, 8C, or 16C nuclei at different input dilutions (Fig. 5E). In general, the relative band intensities for the different variants are similar at all ploidy levels for both wild type and *atxr5/6* double mutants such that the increased abundance of long variants relative to short variants, especially short-a variants, is apparent even in 2C nuclei of *atxr5/6* mutants. Importantly, the twofold increases in PCR products with each twofold increase in ploidy (and therefore nuclear DNA content) indicates that the PCR conditions are within the linear range and therefore are semiquantitative. Collectively, the data of Figure 5, A–E, suggest that in *atxr5/6* mutants, rRNA gene long variants increase in copy number at the expense of short variants. The change in abundance of the variants correlates with the apparent switch in the dominance relationship such that long variants are now expressed.

The changes in rRNA gene variant expression in *suvh4 suvh5 suvh6* triple mutants and *atxr5 atxr6* double mutants prompted an examination of a *suvh4 suvh5 suvh6 atxr5 atxr6* quintuple mutant (Fig. 5F,G). Interestingly, the effects of the mutations are additive such that all rRNA gene variants are expressed (Fig. 5F) without any apparent loss of the short-a variants at the DNA level (Fig. 5G).

Subnuclear distribution of NORs is altered in atxr5/6

In *A. thaliana* leaf nuclei at interphase, the inactive rRNA genes within the NORs are highly condensed and yield punctate signals at the external periphery of the nucleolus upon fluorescent in situ hybridization (FISH) using rRNA gene probes (Fig. 6A, green signals). These condensed portions of the NORs coincide with chromocenters that are composed of a variety of repetitive elements and that stain intensively with the fluorescent DNA-binding dye DAPI (4′, 6-diamidino-2-phenylindole) (Fig. 6A). Repetitive arrays of 5S rRNA genes are included among these repeats (Fig. 6A, red FISH signals). There are two NORs in each haploid *A. thaliana* genome, one located on chromosome 2 (NOR2) and the other located on chromosome 4 (NOR4), each composed of ~375 tandemly repeated rRNA genes and each spanning ~4 Mb of chromosomal DNA (Copenhaver and Pikaard 1996a,b). NORs tend to coalesce during interphase such that it is relatively rare to observe four NOR-FISH signals in diploid nuclei. Instead, two or three NOR-FISH signals are most commonly observed (Fig. 6B). Pol I transcription of rRNA genes takes place in the nucleolus, which is enriched in RNA but contains relatively little DNA, such that the nucleolus appears as a dark hole in DAPI-stained nuclei (Fig. 6A). Active rRNA genes within a NOR are highly decondensed within the nucleolus such that their FISH signals are below the limits of our detection but emanate from NORs associated with the nucleolus (Raska et al. 2006; McStay and Grummt 2008).

Because short rRNA gene variants are predominantly expressed in wild type, long rRNA gene variants are expressed in *atxr5/6* mutants, and both are expressed in *atxr5*, we compared the NOR-FISH patterns in nuclei of the three genotypes. The number of NOR-FISH signals is the same in Col-0, *atxr5*, and *atxr5/6* double mutants, with two to three signals commonly observed in each (Fig. 6B). However, the number of NOR-FISH signals that associate with the nucleolus increases in *atxr5* mutants and further increases in *atxr5/6* double mutants (Fig. 6C). Whereas the vast majority of wild-type nuclei have two nucleolus-associated NOR-FISH signals, and only ~5% have three, the number of nucleolus-associated NOR-FISH signals increases to 24% in *atxr5* and 62% in *atxr5/6* double mutants. These observations indicate that changes

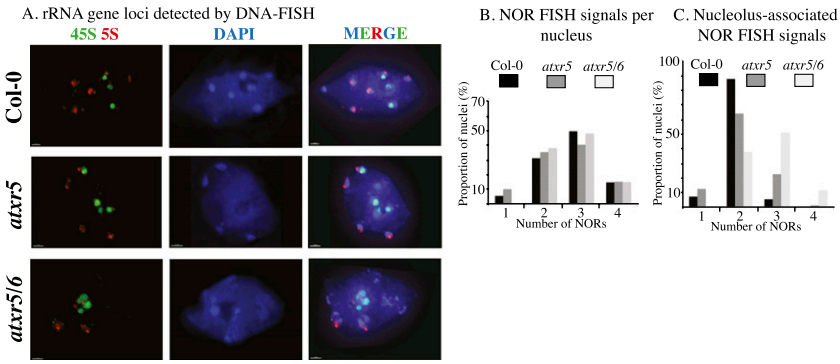


Figure 6. rRNA subnuclear organization is altered in *atxr5/6*. (*A*) FISH localization of 45S loci (NORs; green signals) and 5S (red) rRNA gene loci in leaf interphase nuclei, comparing wild type (Col-0), *atxr5* mutants, and *atxr5/6* double mutants. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar, 5 μm. (*B*,*C*) Histograms representing the number of NOR-FISH signals observed per nucleus (*B*) or the proportion of nucleolus-associated NOR-FISH signals (*C*).

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

in variant expression in the mutants correlate with changes in rRNA gene localization within the nucleus, as was previously demonstrated for *hda6* mutants, too (Earley et al. 2010).

Discussion

Studies in yeast, mammals, and plants suggest that rRNA gene dosage control is achieved through a combination of chromosome-level adjustments that dictate the number of active (or silenced) genes, as well as gene-level fine-scale adjustments that regulate promoter activity or RNA polymerase elongation rates. It is clear that epigenetic mechanisms, including histone modifications and cytosine methylation, are associated with the repression of excess rRNA genes at the chromosomal level (Grummt and Pikaard 2003; Lawrence and Pikaard 2004; Grummt 2007; McStay and Grummt 2008; McKeown and Shaw 2009). However, the mechanisms by which specific rRNA genes are chosen for activation or repression remain unclear.

Our study provides new insights into both the chromosome-scale and gene-scale mechanisms involved in rRNA gene choice and dosage control, with a focus on the roles of histone H3 methylation in these processes. On the chromosomal scale, we found that the H3K27 monomethylases ATXR5 and ATXR6 influence which sets of rRNA gene variants are expressed or silenced. Importantly, the discovery by Jacob et al. (2010) that heterochromatic regions that are normally enriched in repressive H3K27me1 and H3K9me2 marks are overreplicated in *atxr5* and *atxr6* mutants provides a plausible explanation for our observations. The inactive fraction of rRNA genes that is external to the nucleolus is assembled into heterochromatin and condensed, along with other heterochromatic sequences, within the chromocenters that stain intensively with DAPI (see Fig. 6). Our studies suggest that the inactive rRNA gene pool is greatly enriched for the long rRNA gene variants, which account for half of the total number of rRNA genes, yet are expressed at very low levels compared with short variants (a and b subclasses combined) during vegetative growth (see Fig. 5). In contrast, the active gene pool is biased toward the short-a variants, which are preferentially expressed despite the fact that their abundance is similar to the abundance of short-b variants. In *atxr5* mutants, PCR amplification of genomic DNA indicates that the dose of long variants increases in the genome, and in the *atxr5 atxr6* double mutants, this increase is even more apparent and is accompanied by a decrease in the normally dominant short-a variants. One hypothesis to explain these observations is that the normally silenced class of rRNA genes (the long variants) is overreplicated relative to the normally active class (the short-a variants) in *atxr5* and *atxr6* mutants as a consequence of the loss of the H3K27me1 chromatin mark. In contrast, the normally active set of rRNA genes (short-a, in particular) might not overreplicate. Based on previous studies (Copenhaver and Pikaard 1996a,b), we predict that the different variants are clustered and not interspersed randomly at NORs. Therefore, intra-NOR recombination events involving endoreduplicated long variants might then lead to stable increases in their relative abundance while deleting short variants, explaining the changes in the relative abundance of the long, short-a, and short-b variants in *atxr5 atxr6* double mutants (see Fig. 5). The change in rRNA gene variant abundance presumably tips the balance toward long variant expression during dosage control (Fig. 7A,B). We envision that the tipping process is a consequence of cooperative effects among active genes experienced at

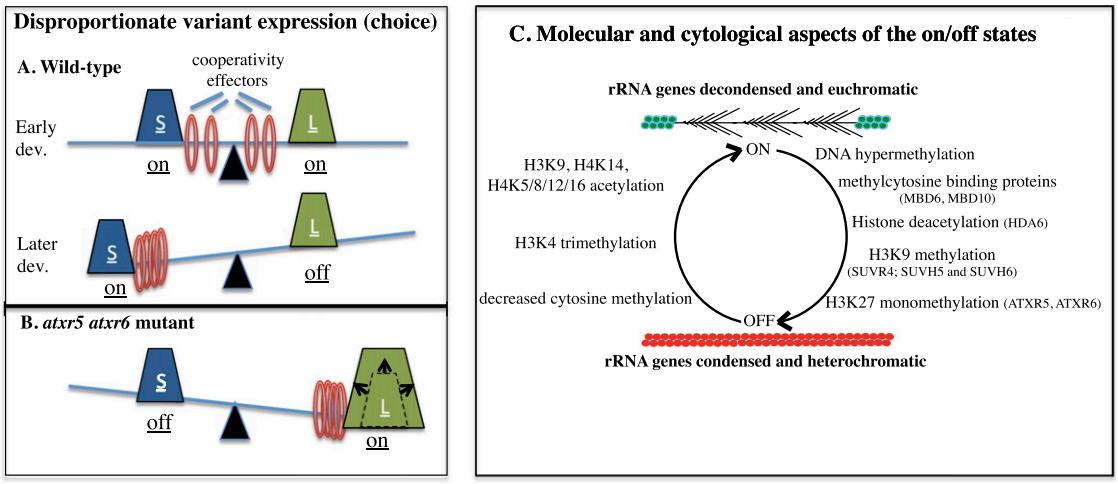


Figure 7. rRNA gene dose and dosage control. (*A*) The model depicts the roles of rRNA gene dose and unknown cooperative effects in the disproportionate expression of specific gene variants. The number of long (L) and short (S) variants are similar in *A. thaliana* Col-0 and are thus depicted as weights of equal mass in wild-type cells. Molecular or cellular factors that assist in the cooperative expression of groups of rRNA genes are depicted as ring weights that can slide in either direction. Early in development, long and short variants are each expressed. Short variants become progressively more dominant as development proceeds (Earley et al. 2010). (*B*) In *atxr5 atxr6* double mutants, long variants increase in copy number relative to short variants, altering the balance in favor of long variant expression. (*C*) Summary of chromatin modifications and cytological changes associated with the "on" or "off" states of rRNA genes in *Arabidopsis*.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

a subchromosomal level, rather than intrinsic differences in promoter strength or activator-binding affinities among the different variants, as variants are essentially identical in sequence except for the short indels that define the variants at the 3′ ends of their transcribed regions.

The scenario above suggests that ATXR5 and ATXR6 might only affect rRNA gene expression indirectly as a consequence of suppressing heterochromatin overreplication and rRNA gene dose. However, our finding that quintuple *suvh4 suvh5 suvh6 atxr5 atxr6* mutants express all rRNA gene variants without any apparent changes in variant abundance (dose) suggests that H3K27 monomethylation, like H3K9 dimethylation, also affects rRNA gene silencing and dosage control, independent of any effects on endoreduplication. The fact that the *suvh4 suvh5 suvh6* triple mutant suppresses the loss of the short-a variants and the relative increase in long variants in *atxr5 atxr6* mutants is also intriguing and worthy of further study in order to understand the mechanisms responsible.

Our finding that SUVR4 is required for silencing of *A. thaliana*-derived rRNA genes subjected to nucleolar dominance in *A. suecica* is consistent with a study showing that SUVR4 localizes within the nucleolus, suggesting a direct role in rRNA gene regulation (Thorstensen et al. 2006). Moreover, our previous study implicating RNA-directed DNA methylation (RdDM) by the de novo DNA methyltransferase DRM2 in nucleolar dominance (Preuss et al. 2008), coupled with a recent study implicating SUVR4 in RdDM of transposable elements (Veiseth et al. 2011), is consistent with these activities working in collaboration to silence repetitive elements that include rRNA genes.

Interestingly, two different H3K9 methyltransferases, SUVH5 and SUVH6, are required for rRNA gene dosage control during vegetative development in nonhybrid *A. thaliana* (Fig. 3). Studies of duplicated phosphoanthranilate isomerase (*PAI*) genes first revealed the cross-talk between SUVH5- and SUVH6-mediated histone modifications and cytosine methylation (Ebbs and Bender 2006). Our finding that cytosine methylation is decreased at rRNA genes in *suvh5/6* double mutants is generally consistent with these studies. However, thus far, we have been unable to detect changes in the H3K9 methylation at rRNA genes in mature leaves of *suvh5/6* double mutants (see Fig. 3B). One possibility is that SUVH5 and SUVH6 may exert an effect on rRNA gene H3K9 methylation early in vegetative development, at a time when the choice mechanism for long variant-specific silencing is operational. Cross-talk with the cytosine methylation machinery might then establish cytosine methylation patterns that persist among clonally related cells as a result of maintenance methylation, even if the initial histone modifications involved in establishing these cytosine methylation patterns no longer persist. Alternatively, it is plausible that a function distinct from H3K9 methylation might be required for SUVH5 and SUVH6 to affect rRNA gene silencing. For instance, SUVH2 and SUVH9 lack catalytically functional SET domains, yet are required for silencing at some loci. Interestingly, disruption of the methylcytosine-binding SRA domains of SUVH2 and SUVH9 releases silencing and correlates with loss of DNA methylation at affected loci (Johnson et al. 2008). Therefore, recruitment of other chromatin modifiers, rather than histone methylation, could be an important aspect of SUVH5 and SUVH6 function, too.

Our comparative studies of differential rRNA gene silencing in allotetraploid *A. suecica* and nonhybrid *A. thaliana* suggest that the epigenetic mechanisms involved in the two genomic contexts are similar, but not identical. Although both require HDA6 as well as involvement of H3K9 methyltransferases, the specific H3K9 methylases involved are different. Likewise, cytosine methylation is implicated in rRNA gene silencing in both *A. suecica* and *A. thaliana*, but CHH methylation upstream of the transcription start site appears to correlate with silencing in *A. suecica*, and CG methylation in the region just downstream from the transcription start site correlates with silencing in *A. thaliana*. Whether these differences are superficial or reflective of different mechanisms or pathways is not yet clear.

Materials and methods

Plant materials

Genotypes used in the study were *A. thaliana* ecotype Col-0 and *A. suecica* laboratory strain LC1. Homozygous mutants in the *A. thaliana* Col-0 genetic background were *hda6-7* (also known as *rts1-1*) (Aufsatz et al. 2002); *suvh4* (*kyp-6*), *suvh5/6*, and *suvh4/5/6* (Ebbs and Bender 2006); *suvr1, suvr2, suvr1/2, RNAi SUVR4-A3*, and *RNAi SUVR4-B3* (Veiseth et al. 2011); and *atxr5*, *atxr6*, and *atxr5/6* (Jacob et al. 2009).

Generation of amiRNA lines

amiRNAs were designed using the Web MicroRNA Designer tool (WMD3, http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi) as described in Ossowski et al. (2008). Resulting amiRNA constructs were cloned into the expression vector pEarleyGate100 (Earley et al. 2006b). Agrobacterium-mediated transformation of *A. suecica* or *A. thaliana* was performed as previously described (Lawrence and Pikaard 2003).

RNA assays

Total RNA was isolated from 2-wk-old rosettes of *A. thaliana* or 4-wk-old rosettes of *A. suecica* using the RNAeasy Plant minikit (Qiagen). The RNA was treated with Turbo DNase (Ambion) for 45 min. Semiquantitative RT–PCR and quantitative RT–PCR (qRT–PCR) were performed using random-primed cDNA generated from 1.5 μg of total RNA using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). TaqMan probes for qRT-PCR were used to specifically and simultaneously detect *A. thaliana*- or *A. arenosa*-derived rRNA genes of *A. suecica* using an Applied Biosystems model 7500 thermocycler. PCR primers are listed in the Supplemental Material. S1 nuclease protection using an end-labeled oligonucleotide probe matching the *A. thaliana* gene promoter start site was performed as previously described (Lawrence et al. 2004).

Cytosine methylation analyses

Genomic DNA was extracted using an Illustra DNA "phytopure" extraction kit (GE Healthcare). After digestion with

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

BamHI, 2 μg of DNA was bisulfite-treated using an Epitect Bisulfite kit (Qiagen). The region of interest was amplified using primers described in Pontvianne et al. (2010a); resulting PCR products were cloned into pGEM-T-Easy (Promega) and sequenced using an ABI3730 machine. Sequenced clones were analyzed using CyMATE (Hetzl et al. 2007) and graphed using a custom Perl script and Microsoft Excel.

ChIP

ChIP was performed as described previously (Wierzbicki et al. 2008) using anti-H3K9me2 (Abcam), anti-Pol I, or anti-H3K27me1 antibodies as described (Jacob et al. 2009; Earley et al. 2010). DNA was amplified using Platinum Taq Polymerase (Invitrogen), SYBR Green I (Invitrogen), Internal Reference dye (Sigma), and an Applied Biosystems model 7500 thermocycler. Results were analyzed using the comparative CT method (Livak and Schmittgen 2001) relative to input.

For the ChIP coupled with deep sequencing (ChIP-seq) analyses shown in Supplemental Figure S4, genomic sequencing reads were mapped to a previously described rDNA sequence (Cokus et al. 2008) using Bowtie (Langmead et al. 2009) by allowing up to two mismatches and retaining reads that mapped to multiple locations.

Relative rRNA gene copy number quantitation

For the copy number analysis in Figure 5, Illumina sequencing read counts at each rRNA gene position were normalized by the total number of mapping reads in the *Arabidopsis* genome to correct for differences in sequencing depths, as described in Jacob et al. (2010).

DNA-FISH

DNA-FISH analyses were performed using nuclei from leaves of 4-wk-old plants, as previously described (Pontvianne et al. 2007). Briefly, 1 g of leaves from 4-wk-old plants was fixed for 20 min in 4% formaldehyde in Tris buffer (10 mM Tris-HCL at pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl), then chopped as finely as possible with a razor blade in 0.5 mL of LB01 buffer (15 mM Tris-HCl at pH 7.5, 2 mM NaEDTA, 0.5 mM spermine, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.1% Triton X-100). The lysate was filtered through a 40-μm cell strainer (BD Falcon), and 12 μL of sorting buffer (100 mM Tris-HCl at pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl2, 0.05% Tween-20, 5% sucrose) was added per 3 μL of cell/nuclei suspension; this mixture was then spread on a round coverslip. After fixation in 2% formaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline), slides were incubated for 30 min at 60°C prior to RNase A digestion (60 min at 37°C with 100 μg/mL RNase A). The sample on the coverslip was then washed three times in 2× SSC and then dehydrated in an ethanol series (70%, 90%, and 100% for 2 min each) prior to hybridization in formamide buffer (50% formamide, 2× SSC, 50 mM sodium phosphate at pH 7.0, 10% dextran sulphate) with 5S or 45S rRNA gene probes labeled with biotin-16-UTP (Roche) or digoxigenin-11-UTP (Roche). After overnight hybridization, slides were washed successively as follows: in 2× SSC for 5 min at 42°C, in 0.1× SSC for 5 min at 42°C, in 2× SSC for 3 min at 42°C, and in 2× SSC/0.1% Tween-20 at room temperature. Avidin conjugated with Texas Red (1:500; Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100; Vector Laboratories) and avidin-Texas Red (1:500) were used for the detection of the biotin-labeled probe; mouse anti-digoxigenin (1:125; Roche) followed by rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500; Sigma) and Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes) were used for the detection of the digoxigenin-labeled probe. Nuclei were then counterstained with DAPI. An Applied Precision DeltaVision personal DV microscope and SoftWorx and Imaris imaging software were used to analyze the data.

Acknowledgments

We thank Tage Thorstensen and Reidunn Aalen for providing *suvr1*, *suvr2*, *suvr1/2*, and *SUVR4* RNAi lines, as well as anti-SUVR4 antisera. We thank Judith Bender for *suvh5/6* and *suvh4/5/6* seeds. We thank Ross Cocklin for ChIP experiments not shown, Chantal Leblanc for help with DNA-FISH, and Yannick Jacob for fruitful discussions. We thank Jim Powers and the Indiana University Bloomington (IUB) Light Microscopy Imaging Center and Christiane Hassel of the IUB Flow Cytometry Core Facility for their expert help. This work was supported by National Institutes of Health grants GM60380 (to C.S.P) and GM075060 (to S.D.M.). T.B. was supported by a Ruth L. Kirschstein National Research Service Award. S.E.J. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute. C.S.P. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute and Gordon and Betty Moore Foundation. T.B. performed the analyses of bisulfite sequencing data and the PCR analyses in Figure 5, E–G, and Supplemental Figure S1C. C.C. performed bisulfite sequencing analyses of Figure 4, B and C. W.F. performed ChIP for Figure 5B, isolated RNA for Figure 5F, and helped with FACS sorting of nuclei for Figure 5E. H.S. and S.E.J. provided Illumina sequence data in Figure 5D and Supplemental Figure S4. H.S. generated the atxr5/6 suvh4/5/6 quintuple mutant. F.P. performed all other experiments. F.P., T.B., and C.S.P. wrote the manuscript.

References

Abou-Ellail M, Cooke R, Saez-Vasquez J. 2011. Variations in a team: Major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2:** 204–299.

Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJ. 2002. HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J* **21:** 6832–6841.

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

Bell O, Tiwari VK, Thoma NH, Schubeler D. 2011. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* **12:** 554–564.

Chen ZJ, Pikaard CS. 1997. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: A role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev* **11:** 2124–2136.

Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. 1998. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci* **95:** 14891–14896.

Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE. 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452:** 215–219.

Copenhaver GP, Pikaard CS. 1996a. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* **9:** 259–272.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copenhaver GP, Pikaard CS. 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 gene homogenization during concerted evolution. *Plant* **9:** 273–282.

Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS. 2006a. Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* **20:** 1283–1293.

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS. 2006b. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45:** 616–629.

Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: Suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* **24:** 1119–1132.

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

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

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* **89:** 1827–1831.

Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112:** 761–772.

Granneman S, Baserga SJ. 2005. Crosstalk in gene expression: Coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **17:** 281–286.

Grummt I. 2007. Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum Mol Genet* **16:** R21–R27. doi: 10.1093/hmg/ddm020.

Grummt I, Pikaard CS. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4:** 641–649.

Haaf T, Hayman DL, Schmid M. 1991. Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res* **193:** 78–86.

Hetzl J, Foerster AM, Raidl G, Mittelsten Scheid O. 2007. CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J* **51:** 526–536.

Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416:** 556–560.

Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD. 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16:** 763–768.

Jacob Y, Stroud H, Leblanc C, Feng S, Zhuo L, Caro E, Hassel C, Gutierrez C, Michaels SD, Jacobsen SE. 2010. Regulation of heterochromatic DNA replication by histone H3 lysine 27 methyltransferases. *Nature* **466:** 987–991.

Jasencakova Z, Soppe WJ, Meister A, Gernand D, Turner BM, Schubert I. 2003. Histone modifications in *Arabidopsis*—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* **33:** 471–480.

Johnson L, Cao X, Jacobsen S. 2002. Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol* **12:** 1360–1367.

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

Johnson LM, Law JA, Khattar A, Henderson IR, Jacobsen SE. 2008. SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. *PLoS Genet* **4:** e1000280. doi: 10.1371/journal.pgen.1000280.

Kressler D, Hurt E, Bassler J. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* **1803:** 673–683.

Krichevsky A, Gutgarts H, Kozlovsky SV, Tzfira T, Sutton A, Sternglanz R, Mandel G, Citovsky V. 2007. C2H2 zinc finger-SET histone methyltransferase is a plant-specific chromatin modifier. *Dev Biol* **303:** 259–269.

Lachner M, Jenuwein T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* **14:** 286–298.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10:** R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11:** 204–220.

Lawrence RJ, Pikaard CS. 2003. Transgene-induced RNA interference: A strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. *Plant J* **36:** 114–121.

Lawrence RJ, Pikaard CS. 2004. Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle* **3:** 880–883.

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

Lewis MS, Pikaard CS. 2001. Restricted chromosomal silencing in nucleolar dominance. *Proc Natl Acad Sci* **98:** 14536–14540.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25:** 402–408.

Long EO, Dawid IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49:** 727–764.

Malagnac F, Bartee L, Bender J. 2002. An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J* **21:** 6842–6852.

McKeown PC, Shaw PJ. 2009. Chromatin: Linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma* **118:** 11–23.

McStay B. 2006. Nucleolar dominance: A model for rRNA gene silencing. *Genes Dev* **20:** 1207–1214.

McStay B, Grummt I. 2008. The epigenetics of rRNA genes: From molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24:** 131–157.

Mongelard F, Bouvet P. 2007. Nucleolin: A multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* **17:** 80–86.

Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V. 2007. A housekeeper with power of attorney: The rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64:** 29–49.

Ossowski S, Schwab R, Weigel D. 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* **53:** 674–690.

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

Pontes O, Lawrence RJ, Silva M, Preuss S, Costa-Nunes P, Earley K, Neves N, Viegas W, Pikaard CS. 2007. Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

dominance. *PLoS ONE* **2:** e1157. doi: 10.1371/journal.pone.0001157.

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

Pontvianne F, Abou-Ellail M, Douet J, Comella P, Matia I, Chandrasekhara C, Debures A, Blevins T, Cooke R, Medina FJ, et al. 2010a. 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, Pikaard CS. 2010b. *Arabidopsis* histone lysine methyltransferases. *Adv Bot Res* **53:** 1–22.

Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrence RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JC, Baulcombe DC, Viegas W, et al. 2008. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* **32:** 673–684.

Rajakumara E, Law JA, Simanshu DK, Voigt P, Johnson LM, Reinberg D, Patel DJ, Jacobsen SE. 2011. A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the *Arabidopsis* SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. *Genes Dev* **25:** 137–152.

Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* **18:** 325–334.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406:** 593–599.

Saez-Vasquez J, Echeverria M. 2007. Polymerase I transcription. In*Regulation of transcription in plants. Annual plant reviews* vol. 29 (ed. KD Grasser), pp. 162–183. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18:** 1121–1133.

Thorstensen T, Fischer A, Sandvik SV, Johnsen SS, Grini PE, Reuter G, Aalen RB. 2006. The *Arabidopsis* SUVR4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic Acids Res* **34:** 5461–5470.

Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* **22:** 351–356.

Veiseth SV, Rahman MA, Yap KL, Fischer A, Egge-Jacobsen W, Reuter G, Zhou MM, Aalen RB, Thorstensen T. 2011. The SUVR4 histone lysine methyltransferase binds ubiquitin and converts H3K9me1 to H3K9me3 on transposon chromatin in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **7:** e1001325. doi: 10.1371/journal.pgen.1001325.

Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. 2008. Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135:** 635–648.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in *Arabidopsis*

Frédéric Pontvianne, Todd Blevins, Chinmayi Chandrasekhara, et al.

Genes Dev. 2012 26: 945-957
Access the most recent version at doi:10.1101/gad.182865.111

Supplemental Material http://genesdev.cshlp.org/content/suppl/2012/04/25/26.9.945.DC1.html

References This article cites 60 articles, 18 of which can be accessed free at:
http://genesdev.cshlp.org/content/26/9/945.full.html#ref-list-1

Open Access Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

Email Alerting Service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or **click here.**

To subscribe to *Genes & Development* go to:
http://genesdev.cshlp.org/subscriptions

Copyright © 2012 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

RESEARCH COMMUNICATION

Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states

Frederic Pontvianne,[1,2,9,12] Todd Blevins,[1,2,3,8] Chinmayi Chandrasekhara,[1,2,8] Iva Mozgová,[4,8,10] Christiane Hassel,[5] Olga M.F. Pontes,[6] Sarah Tucker,[7,11] Petr Mokroš,[4] Veronika Muchová,[4] Jiří Fajkus,[4] and Craig S. Pikaard[1,2,3,12]

[1]Department of Biology, [2]Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA; [3]Howard Hughes Medical Institute, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA; [4]CEITEC-Central European Institute of Technology and Faculty of Science, Masaryk University, CZ-62500 Brno, Czech Republic; [5]Flow Cytometry Core Facility, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA; [6]Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87131, USA; [7]Division of Biology and Biomedical Sciences, Washington University, St. Louis, Missouri 63130, USA

Eukaryotes can have thousands of 45S ribosomal RNA (rRNA) genes, many of which are silenced during development. Using fluorescence-activated sorting techniques, we show that active rRNA genes in *Arabidopsis thaliana* are present within sorted nucleoli, whereas silenced rRNA genes are excluded. DNA methyltransferase (*met1*), histone deacetylase (*hda6*), or chromatin assembly (*caf1*) mutants that disrupt silencing abrogate this nucleoplasmic–nucleolar partitioning. Bisulfite sequencing data indicate that active nucleolar rRNA genes are nearly completely demethylated at promoter CGs, whereas silenced genes are nearly fully methylated. Collectively, the data reveal that rRNA genes occupy distinct but changeable nuclear territories according to their epigenetic state.

Supplemental material is available for this article.

Received May 9, 2013; revised version accepted June 14, 2013.

In eukaryotes, 45S ribosomal RNA (rRNA) genes are tandemly arrayed at nucleolus organizer regions (NORs) (see Fig. 1A). Their transcripts, generated by RNA polymerase I (Pol I) in the nucleolus, are processed into the 18S, 5.8S, and 25-28S (depending on species) catalytic RNAs of ribosomes (Moss et al. 2007; Kressler et al. 2010; Hannan et al. 2013). The number of active 45S rRNA genes changes with the physiological needs of the cell (McStay and Grummt 2008; Tucker et al. 2010). For instance, *Arabidopsis thaliana* has ~1500 rRNA genes per diploid genome (Copenhaver et al. 1995; Copenhaver and Pikaard 1996), with subtypes distinguishable by insertions/deletions at their 3′ ends (Fig. 1A). All subtypes are expressed immediately following germination, but by ~10 d of seedling growth, the variant 1 subtype (Fig. 1A), accounting for ~50% of all rRNA genes, is silenced via epigenetic mechanisms that include changes in DNA methylation and histone modification (Earley et al. 2006, 2010; Pontvianne et al. 2010, 2012). Chromatin modifications mediate rRNA gene dosage control in yeast, mouse, and human cells as well (Sandmeier et al. 2002; McStay and Grummt 2008; Grummt and Langst 2013).

To examine the subnuclear distribution of active and silenced rRNA genes, we adapted fluorescence-activated sorting technology to isolate whole *A. thaliana* nuclei or nucleoli liberated from sonicated nuclei. Exploiting sequence variation among differentially expressed rRNA gene subtypes and mutations that disrupt rRNA gene chromatin modifications or copy number, we show that rRNA genes occupy alternative subnuclear compartments depending on their activity state.

Results and Discussion

Partitioning of active versus inactive rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm

A. thaliana has NORs on chromosomes 2 and 4, each consisting of ~375 rRNA genes and spanning ~4 Mb (Copenhaver et al. 1995; Copenhaver and Pikaard 1996). Pol I, which transcribes 45S rRNA genes, localizes to the nucleolus of interphase cells (Fig. 1B, green signal). The nucleolus is rich in RNA and proteins but has little DNA, thus appearing as a black hole in nuclei stained with the DNA-binding dye DAPI (Fig. 1B, gray signal). 45S pre-rRNA transcripts are detected throughout the nucleolus by RNA-FISH (fluorescent in situ hybridization) (Fig. 1C, bottom row). However, the most prominent 45S rRNA gene DNA-FISH signals are external to the nucleolus (Fig. 1B [red signals], C [top row, green signals]; note that NOR associations can result in fewer than four signals). rRNA genes inside the nucleolus are decondensed and more difficult to detect by DNA-FISH, depending on the extent of their dispersal (e.g., cf. the two nuclei in Fig. 1B).

HISTONE DEACETYLASE 6 (HDA6) is required for uniparental rRNA gene silencing in hybrid *Arabidopsis suecica* and for developmentally regulated silencing of variant 1 rRNA genes in nonhybrid *A. thaliana* (Earley et al. 2006, 2010). HDA6 localizes throughout nuclei, including the nucleolus (Fig. 1C). In *hda6* mutants, NORs decondense (Probst et al. 2004; Earley et al. 2006), and rRNA gene FISH signals inside the nucleolus increase (Fig. 1D). In leaves of wild-type plants (ecotype Col-0), variant 2 and 3 rRNA gene subtypes are expressed,

[*Keywords*: transcription; gene silencing; DNA methylation; histone deacetylation; chromatin assembly; RNA polymerase I; ribosomal RNA gene]
[8]These authors contributed equally to this work.
Present addresses: [9]Laboratoire Genome et Developpement des Plantes, UMR 5096 CNRS-University of Perpignan via Domitia, Perpignan, France; [10]Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Linnean Center for Plant Biology, Uppsala, Sweden; [11]Monsanto Company, St. Louis, MO 63107, USA
[12]Corresponding authors
E-mail cpikaard@indiana.edu
E-mail frederic.pontvianne@univ-perp.fr
Article is online at http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.221648.113. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

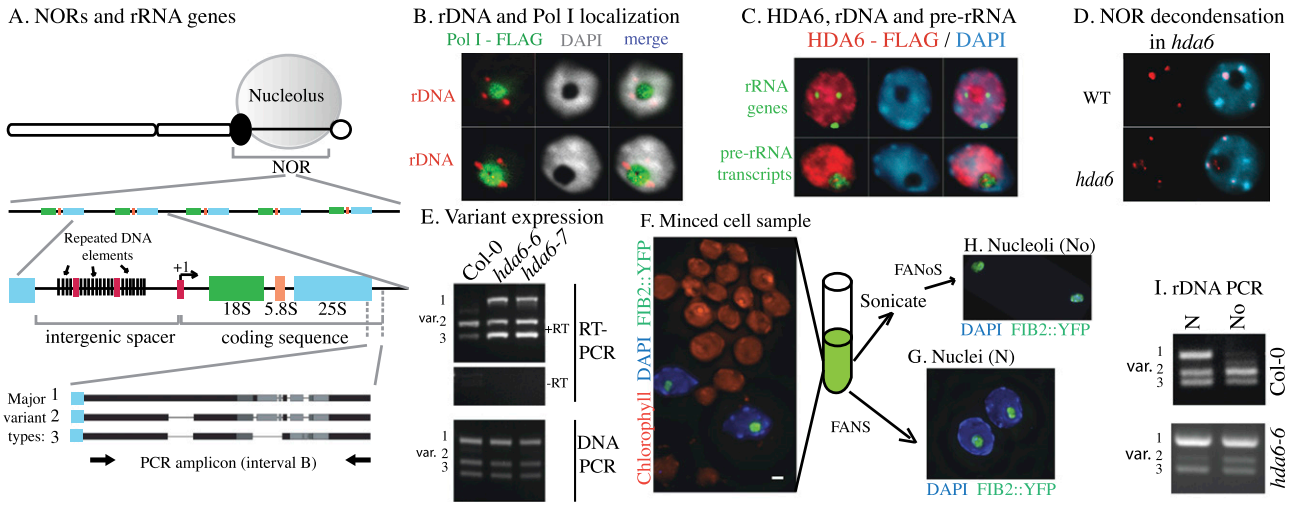


Figure 1. Partitioning of active and silent rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm. (*A*) Relationships between the nucleolus, NORs, and 45S rRNA gene repeats. The drawing at the *top* depicts a metaphase chromosome with the remnants of a nucleolus associated with the secondary constriction, the location of active rRNA genes in the preceding interphase. The black oval represents a chromomere in which rRNA genes are assembled into dense heterochromatin. In *A. thaliana*, insertions/deletions in the 3′ external transcribed region define rRNA gene variant types. (*B*) Localization of rRNA genes (rDNA) and Pol I. DNA-FISH using an rRNA gene probe (red signals) and immunolocalization of Flag-tagged Pol I using an anti-Flag antibody (green signals) were performed in *A. thaliana* interphase nuclei. DNA was counterstained with DAPI (gray signals). (*C*) Subnuclear localization of rRNA genes, pre-rRNA transcripts, and Flag-tagged HDA6. rRNA gene or transcript FISH signals are shown in green, immunolocalized HDA6 is in red, and DAPI-stained DNA is in blue. Merged signals are shown in the *right* column. (*D*) DNA-FISH detection of rRNA genes in wild-type (Col-0) and *hda6* nuclei. rRNA gene FISH signals are shown in red and are merged with the DAPI (blue) image in the *right* column. (*E*) Detection of rRNA gene variant types and their transcripts by PCR using genomic DNA or reverse-transcribed (RT) cDNA of wild-type (Col-0) or *hda6* plants. The amplified region is shown in *A*. (*F*) Leaf cell homogenate of a FIB2:YFP plant stained with DAPI and subjected to fluorescence microscopy. Chloroplasts fluoresce red, DAPI-stained DNA is blue, and nucleolar FIB2:YFP is green. (*G*) Purified nuclei obtained by FANS. (*H*) Purified nucleoli obtained by FANoS. (*I*) PCR detection of rRNA gene variant types in DNA of purified nuclei (N) or nucleoli (No) of wild-type (Col-0) or *hda6* plants. The PCR amplicon is shown in *A*.

and variant 1 genes are silenced (Fig. 1E, RT–PCR primer locations are shown in A). However, in *hda6-6* or *hda6-7* mutants, all variant subtypes are expressed (Fig. 1E).

To determine whether both active and silenced rRNA genes are associated with nucleoli, we performed fluorescence-activated sorting of whole nuclei or isolated nucleoli from plants expressing the nucleolar protein FIBRILLARIN2 fused to YFP (yellow fluorescent protein) (Barneche et al. 2000). FIB2:YFP localizes specifically within the nucleolus, as shown in Figure 1F. Fluorescence-activated nuclear sorting (FANS) of cell homogenates yielded homogeneous nuclei (Fig. 1G; Supplemental Fig. S1A). Alternatively, cell extracts were sonicated to disrupt nuclei and then subjected to fluorescence-activated nucleolar sorting (FANoS), yielding nucleoli free of intact nuclei, other organelles, or cellular debris (Fig. 1H; Supplemental Fig. S1B,C).

rRNA gene subtypes in isolated nuclei or nucleoli were identified by PCR amplification using primers flanking the variable region (see Fig. 1A). All variant types are present in nuclei of wild-type Col-0 or *hda6* mutants, as expected (Fig. 1I). However, in nucleoli of wild-type plants, variant 2- and 3-type rRNA genes are enriched (Fig. 1I, top row), correlating with their selective expression (see Fig. 1E). In *hda6* mutants, in which variant 1 gene silencing does not occur, variant 1 genes are also present in nucleoli (Fig. 1I, bottom row). Collectively, these results indicate that rRNA genes are present in nucleoli when active and are excluded from nucleoli when silenced.

MET1-dependent CG methylation is implicated in rRNA gene subtype silencing

In *A. thaliana*, cytosine methylation at CG motifs is maintained by MET1 (the ortholog of mammalian DNMT1), CHG methylation (where H is A, T, or C) is maintained by CMT3, and RNA-directed CHH methylation is mediated by DRM2, whose paralog, DRM1, may function in some cells (Law and Jacobsen 2010). Variant 1 rRNA gene silencing fails to occur in *met1* mutants (Fig. 2A), corresponding with the loss of promoter region CG methylation (Fig. 2B). In contrast, *drm1-*, *drm2-*, or *cmt3*-null mutations, alone or in combination, reduce promoter CHG and CHH methylation (Fig. 2B) but have negligible effects on variant 1 silencing (Fig. 2A).

Active rRNA genes in the nucleolus are CG hypomethylated, as in met1 mutants

MET1's involvement in rRNA gene silencing prompted a comparison of CG methylation among nucleolar versus nuclear rRNA genes. In Figure 2, C and D, 21 CG positions in the downstream promoter region (same region as in Fig. 2B) are shown as filled (methylated) or open (unmethylated) circles, with each row representing an independent clone following bisulfite sequencing. In wild-type nuclei, 37% of promoter clones are unmethylated or lightly methylated (fewer than three ^{me}CGs), a similar number of clones (40%) is heavily methylated (11 or more ^{me}CGs), and 23% show intermediate levels of methylation (four to 10 ^{me}CGs) (Fig. 2C). In nucleoli,

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

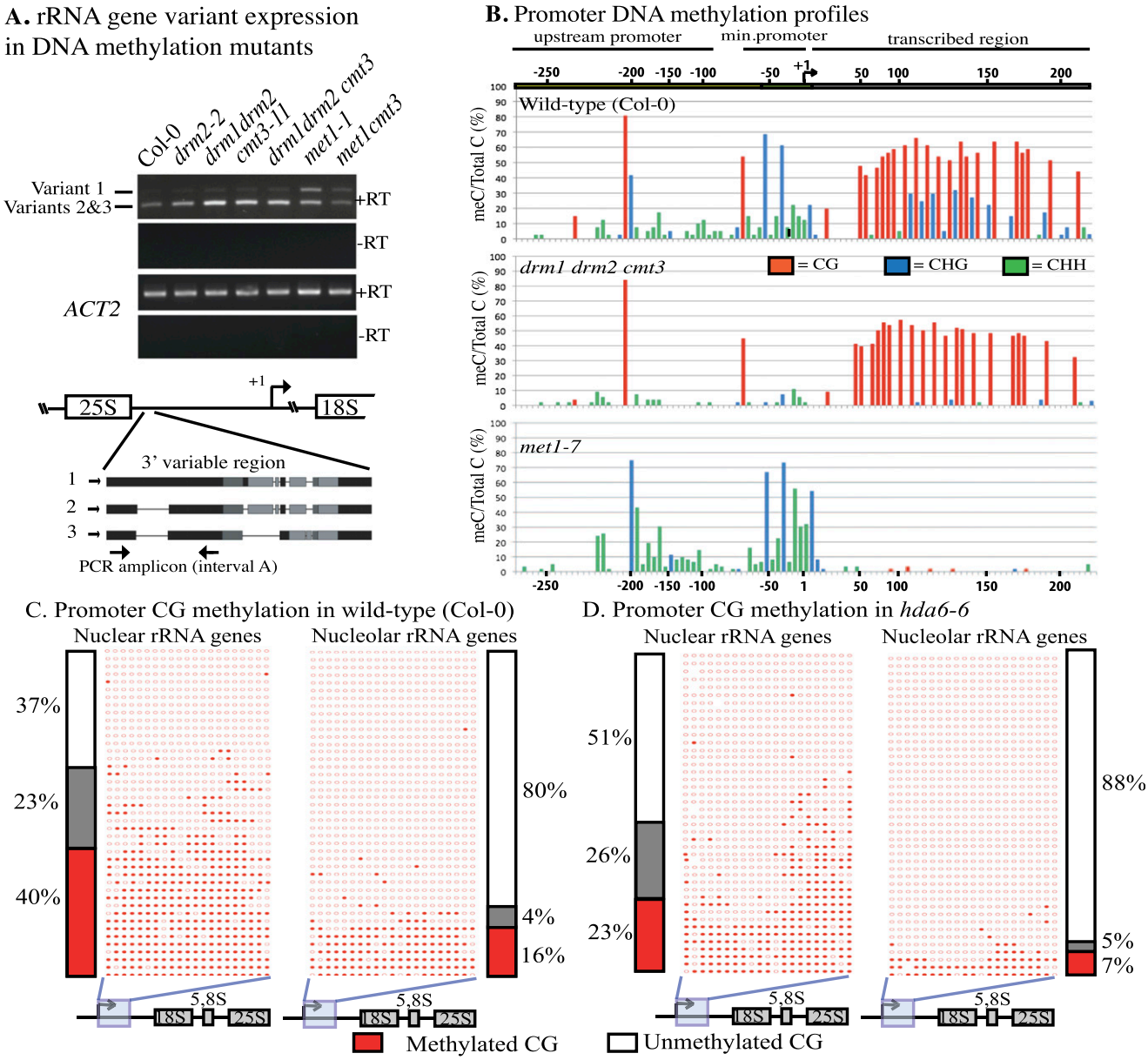


Figure 2. MET1-dependent CG methylation is required for variant 1-type rRNA gene silencing. (*A*) rRNA gene variant expression in wild type (Col-0) or *drm2-2, drm1 drm2, cmt3-11, drm1 drm2 cmt3, met1-1,* or *met1 cmt3* mutants. RT–PCR using primers that discriminate variant 1- from variant 2- and 3-type rRNA genes was conducted (see the diagram for primer locations). RT–PCR of *ACTIN2* (*ACT2*) mRNA serves as a positive control. Reactions lacking reverse transcriptase (−RT) serve as negative controls. (*B*) Frequencies at which individual cytosines are methylated between −316 and +243 relative to the transcription start site (+1), determined by bisulfite sequencing. Wild-type Col-0, *drm1 drm2 cmt3* triple mutants, and *met1-7* mutants are compared. Approximately 40 independent promoter clones were sequenced for each genotype. Cytosine-depleted regions are compressed on the *X*-axis. (*C*,*D*) Cytosine methylation in the downstream promoter region of rRNA genes in purified nuclei or nucleoli from wild-type or *hda6* leaves, determined by bisulfite sequencing. Positions of methylated (filled circles) or unmethylated (open circles) cytosines in CG motifs of 43 independent promoter clone sequences are shown. Methylation haplotypes are grouped according to methylation density. Histograms show frequencies of hypomethylated haplotypes (white), haplotypes with intermediate methylation (gray), or heavily methylated haplotypes (red).

however, 80% of rRNA gene promoter sequences are unmethylated or lightly methylated, with only 16% heavily methylated.

Promoter cytosine methylation was next examined in *hda6* mutants (Fig. 2D), in which all variants are expressed and nucleolar (see Fig. 1E,I). In *hda6* nuclei, more rRNA gene promoter sequences are unmethylated/lightly methylated compared with wild type (51% vs. 37%), and fewer are heavily methylated (23% vs. 40%). In *hda6* nucleoli, 88% of rRNA gene promoter clones had either zero or only one ^{me}CG (Fig. 2D).

Collectively, the data of Figures 1 and 2 show that approximately half of the total rRNA gene pool is silenced (the variant 1 subtype), that sorted nucleoli are enriched for active rRNA gene variants, and that mutants that disrupt silencing cause all variant types to be

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

nucleolar. Whereas the total pool of nuclear rRNA genes includes heavily methylated and unmethylated promoter sequences in similar proportions (~40% each), the nucleolar rRNA genes are mostly (at least 80%) demethylated, suggesting that the demethylated state is the active state. It then follows that the heavily methylated state is the inactive state. We further deduce that the small fraction of fully methylated rRNA gene promoter sequences detected in purified nucleoli represent silenced rRNA genes located in *cis* to active genes, thereby facilitating their nucleolar association.

Variant-specific silencing is disrupted when rRNA gene copy number is reduced

Because selective rRNA gene silencing is thought to be a form of dosage control, reducing the rRNA gene pool size is expected to increase the proportion of active rRNA genes, as in yeast (French et al. 2003). *Arabidopsis thaliana* FASCIATA 1 (FAS1) and FAS2 are subunits of chromatin assembly factor 1 (CAF1), a histone chaperone implicated in replication-dependent deposition of histones H3 and H4 (Ramirez-Parra and Gutierrez 2007). In *fas1* or *fas2* mutants, 45S rRNA genes are lost (Mozgova et al. 2010), as shown by DNA-FISH (Fig. 3A) or quantitative PCR (qPCR) (Fig. 3B). The latter shows that rRNA gene numbers fall to ~40% of wild type by the second generation (G2) and to ~5%–10% of wild type by G5 before stabilizing in number. Beyond G9, *fas* mutant lines cannot be perpetuated due to sterility resulting from genome instability.

Semiquantitative analysis of rRNA gene variant abundance, assessed by agarose gel electrophoresis of genomic PCR products, shows that all variant types decrease from G2 to G9 in *fas1* and *fas2* mutants (Fig. 3C). The ~40% reduction in rRNA gene number that occurs by G2 (refer to Fig. 3B) is sufficient to abrogate dosage control such that all variant types are expressed (Fig. 3D). In contrast, variant 1 genes are not expressed in wild-type siblings at G2, G5, or G9 (Fig. 3D).

To test whether *fas* mutations affect rRNA gene nucleoplasmic–nucleolar partitioning, we crossed a *fas2-4* mutant (G2) with a FIB2:YFP transgenic plant, collected seeds from their F1 offspring, and identified *fas2-4* homozygotes in the F2 generation. We then used FANS or FANoS to isolate purified nuclei or nucleoli, respectively. All rRNA gene variant types are present in nucleoli of *fas2* mutants (Fig. 3E), consistent with the failure to silence variant 1 genes (Fig. 3D).

Bisulfite sequencing of *fas2-4* nuclear rRNA genes showed that CG hypermethylated sequences are reduced by half compared with wild type (Fig. 3F). However, in isolated nucleoli, the rRNA genes of wild-type and *fas2* plants are similarly demethylated. Collectively, the data indicate that reducing rRNA gene numbers in *fas* mutants abrogates the dosage control system

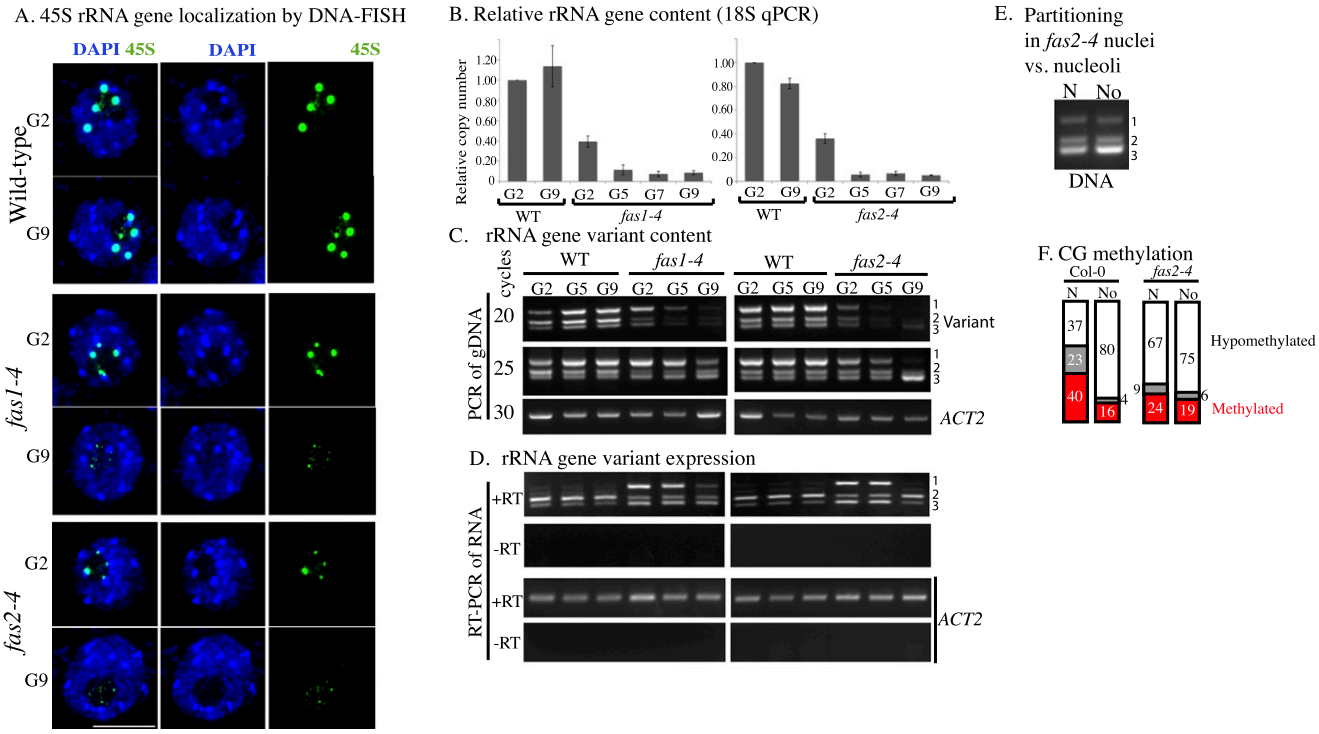


Figure 3. Reducing rRNA gene number in *fas* mutants disrupts variant 1 silencing, nucleolus–nucleoplasm partitioning, and CG methylation. (*A*) rRNA gene localization by DNA-FISH in nuclei of wild type or *fas1* or *fas2* mutants at G2 and G9. Nuclei were counterstained with DAPI. (*B*) qPCR analysis of relative rRNA gene numbers in wild type (WT) versus *fas1-4* or *fas2-4* at G2, G5, G7, or G9. (*C*) Semiquantitative PCR detection of rRNA gene variant types in genomic DNA of *fas1* or *fas2* mutants or lines derived from their wild-type siblings at G2, G5, or G9. Amplification products of rRNA gene variants after 20 or 25 cycles of PCR or of *ACTIN2* after 30 cycles of PCR resolved by agarose gel electrophoresis. (*D*) RT–PCR amplification of rRNA gene variant transcripts or an *ACTIN2* mRNA control. The lane order is the same as in *C*. (*E*) PCR detection of rRNA gene variant types in sorted nuclei or nucleoli of *fas2-4 FIB2:YFP* plants. (*F*) Frequencies of haplotypes showing CG hypomethylation, intermediate methylation, or heavy methylation in wild-type or *fas2-4* nuclei (N) or nucleoli (No) within the rRNA gene promoter downstream region.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

such that variant 1 genes are no longer silenced and hypermethylated, and virtually all rRNA genes become nucleolus-associated.

Methylation density versus site-specific methylation

Our results suggest that active rRNA genes, which localize within the nucleolus, are demethylated, or nearly so, at >20 CG positions adjacent to the transcription start site. In contrast, silenced rRNA genes are deduced to be heavily methylated based on the fact that heavily and lightly methylated rRNA promoter sequences are detected at similar frequency in whole nuclei and that silenced variant 1 type genes account for ~50% of the total rRNA gene pool. These data suggest that quantitative, essentially all-or-nothing, methylation correlates with rRNA gene on or off states in *A. thaliana*, as opposed to specific methylation of single cytosines, as indicated by studies in mice (Santoro and Grummt 2001).

A model for dynamic subnuclear rRNA gene localization

rRNA gene DNA-FISH signals external to the nucleolus are observed in both plant and animal interphase cells. In *Arabidopsis*, these external signals colocalize with histone modifications typical of silent heterochromatin (Lawrence et al. 2004; Earley et al. 2006). In yeast, which have a single NOR, electron microscopy has shown that active and inactive rRNA genes are interspersed with one another (French et al. 2003). However, in plants and mammals, there is evidence that active and silenced rRNA genes can occupy different portions of an NOR. On metaphase chromosomes, secondary constrictions at NORs stain intensively with silver (Goodpasture and Bloom 1975; Roussel and Hernandez-Verdun 1994) due to persistent binding of Pol I transcription factors on rRNA genes that were active in the preceding interphase (Prieto and McStay 2008). Importantly, secondary constrictions and silver-stained regions do not necessarily encompass an entire NOR. Instead, condensed portions of an NOR can be adjacent to a decondensed, silver-stained portion of the NOR (Caperta et al. 2002). Collectively, these cytological observations, combined with our results with sorted nucleoli, suggest that NORs can span the nucleoplasm–nucleolus boundary, with active rRNA genes inside the nucleolus and inactive genes primarily outside (Fig. 4). Silent rRNA genes at the boundary between these sub-NOR domains could account for the minority (<20%) of heavily methylated rRNA genes present in flow-sorted nucleoli. Importantly, our results show that localization inside or outside of the nucleolus is not an absolute property of a given rRNA gene variant type but reflects transcriptional and epigenetic states that are changeable according to the needs of the cell. We reason that excess rRNA genes coalesce into dense heterochromatic structures at the external edge of the nucleolus but spool out into the nucleolus as more rRNA genes are needed. Conversely, excess rRNA genes would be reeled into the external reservoir such that rRNA gene partitioning between the nucleolus and nucleoplasm is the cytological manifestation of dynamic rRNA gene dosage control.

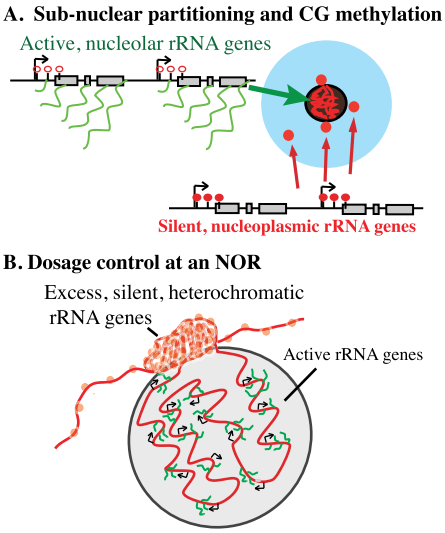


Figure 4. Model for the organization of rRNA genes in interphase nuclei. (*A*) The blue circle represents a nucleus visualized by DAPI staining, with the black hole representing the nucleolus. Results of FANS or FANoS experiments indicate that condensed rRNA gene DNA-FISH signals in the nucleoplasm correspond to silent rRNA genes that are heavily methylated at promoter CG motifs. In contrast, active rRNA genes are decondensed, localized within the nucleolus, and CG-demethylated. (*B*) A single NOR can be composed of condensed, silent rRNA genes external to the nucleolus as well as decondensed, active rRNA genes dispersed within the nucleolus. Changing the number of rRNA genes that spool out from, or are reeled into, the reservoir of rRNA genes at the external periphery of the nucleolus can account for changes in the number of active versus silenced genes during development.

Materials and methods

RT–PCR

RNA was isolated from 2- to 4-wk-old leaves of *A. thaliana* using Plant RNAeasy kits (Qiagen) and treated with Turbo DNase (Ambion) for 60 min. Semiquantitative RT–PCR was performed using random-primed cDNA generated from 1.5 μg of total RNA and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). PCR primers for the rRNA gene variable region were CTCGAGGTTAAATGTTATTACTTGGTAAGATTCCGG (interval A forward), TGGGTTTGTCATATTGAACGTTTGTGTTCATAT CACC (interval A reverse), GACAGACTTGTCCAAAACGCCCACC (interval B forward), and CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT (interval B reverse). ACTIN2 PCR primers were AAGTCATAACCATCG GAGCTG (forward) and ACCAGATAAGACAAGACACAC (reverse).

Cytosine methylation analyses

Genomic DNA was extracted using Illustra DNA phytopure extraction kits (GE Healthcare). After digestion with BamHI, 2 μg of DNA was bisulfite-treated using an EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). The rRNA gene promoter region was PCR-amplified as described previously (Pontvianne et al. 2010) using primers GGATATGATGYAATGTTTTGTGATYG (forward) and CCCATTCTCCTCRACRATTCARC (reverse). PCR products were cloned into pGEM-T-Easy (Promega) and sequenced. Methylation was analyzed using CyMATE (Hetzl et al. 2007) and graphed using a custom Perl script and Microsoft Excel.

Nuclear and nucleolar DNA purification

Leaves (1 g) from 4-wk-old FIB2:YFP plants were fixed for 20 min in 4% formaldehyde in Tris buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl). Leaves were washed twice for 10 min each in ice-cold Tris buffer and minced in 1 mL of 45 mM $MgCl_2$, 20 mM MOPS (pH 7.0),

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

30 mM sodium citrate, and 0.1% Triton X-100 using a razor blade. The homogenate was filtered through 40-μm mesh (BD Falcon) and subjected to FANS or sonicated using a Bioruptor (three 5-min pulses, medium power; Diagenode) to liberate nucleoli that were then sorted by FANoS. Sorting of nuclei or nucleoli was triggered by the FIB2:YFP signal using a BD FACS Aria II. Sorted nuclei or nucleoli were treated with RNase A and proteinase K prior to DNA purification and PCR or bisulfite sequencing analyses.

DNA-FISH and qPCR

DNA-FISH and qPCR analyses of *fas* mutants were performed as previously described (Mozgova et al. 2010) using 18S rRNA gene primers CTAGAGCTAATACGTGCAACAAAC (forward) and GAATCGAACCC TAATTCTCCG (reverse) and UBIQUITIN 10 (UBQ10) control primers AACGGGAAAGACGATTAC (forward) and ACAAGATGAAGGGTG GAC (reverse). DNA-FISH, RNA-FISH, and protein immunolocalization of Flag-tagged proteins were performed as described previously (Pontes et al. 2003, 2006).

Acknowledgments

We thank Jim Powers and the Light Microscopy Imaging Center at Indiana University for microscopy support. This work was supported by the National Institutes of Health grant GM60380 to C.S.P. C.S.P. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute and Gordon and Betty Moore Foundation. T.B. was supported by an NIH Ruth L. Kirschstein National Research Service Award and funds from Howard Hughes Medical Institute. I.M., P.M., V.M., and J.F. were supported by the Czech Science Foundation (P501/11/0289) and project CEITEC-CZ.1.05/1.1.00/02.0068 from the European Regional Development Fund. C.C. did the bisulfite sequencing of Figure 2, T.B. did the DNA methylation analyses of Figure 2B, C.H. did the flow sorting, and O.P. did the FISH and immunolocalizations of Figure 1. I.M. generated consecutive *fas* generations and, with P.M., V.M., and J.F., did the analyses of Figure 3, A and B. F.P. designed and performed all other experiments. F.P. and C.S.P. wrote the manuscript.

References

Barneche F, Steinmetz F, Echeverria M. 2000. Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **275:** 27212–27220.

Caperta AD, Neves N, Morais-Cecilio L, Malho R, Viegas W. 2002. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *J Cell Sci* **115:** 2839–2846.

Copenhaver GP, Pikaard CS. 1996. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* **9:** 259–272.

Copenhaver GP, Doelling JH, Gens S, Pikaard CS. 1995. Use of RFLPs larger than 100 kbp to map the position and internal organization of the nucleolus organizer region on chromosome 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **7:** 273–286.

Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS. 2006. Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* **20:** 1283–1293.

Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: Suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev* **24:** 1119–1132.

French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M, Beyer AL. 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* **23:** 1558–1568.

Goodpasture C, Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53:** 37–50.

Grummt I, Langst G. 2013. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829:** 393–404.

Hannan KM, Sanij E, Rothblum LI, Hannan RD, Pearson RB. 2013. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. *Biochim Biophys Acta* **1829:** 342–360.

Hetzl J, Foerster AM, Raidl G, Mittelsten Scheid O. 2007. CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J* **51:** 526–536.

Kressler D, Hurt E, Bassler J. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* **1803:** 673–683.

Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11:** 204–220.

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

McStay B, Grummt I. 2008. The epigenetics of rRNA genes: From molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24:** 131–157.

Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V. 2007. A housekeeper with power of attorney: The rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64:** 29–49.

Mozgova I, Mokros P, Fajkus J. 2010. Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22:** 2768–2780.

Pontes O, Lawrence RJ, Neves N, Silva M, Lee JH, Chen ZJ, Viegas W, Pikaard CS. 2003. Natural variation in nucleolar dominance reveals the relationship between nucleolus organizer chromatin topology and rRNA gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **100:** 11418–11423.

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

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

Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen SE, Michaels SD, Pikaard CS. 2012. Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **26:** 945–957.

Prieto JL, McStay B. 2008. Pseudo-NORs: A novel model for studying nucleoli. *Biochim Biophys Acta* **1783:** 2116–2123.

Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, Murfett J, Furner I, et al. 2004. *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* **16:** 1021–1034.

Ramirez-Parra E, Gutierrez C. 2007. The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci* **12:** 570–576.

Roussel P, Hernandez-Verdun D. 1994. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* **214:** 465–472.

Sandmeier JJ, French S, Osheim Y, Cheung WL, Gallo CM, Beyer AL, Smith JS. 2002. RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *EMBO J* **21:** 4959–4968.

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

Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* **22:** 351–356.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on March 20, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Genes & Development

Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states

Frederic Pontvianne, Todd Blevins, Chinmayi Chandrasekhara, et al.

Genes Dev. 2013 27: 1545-1550
Access the most recent version at doi:10.1101/gad.221648.113

Supplemental Material http://genesdev.cshlp.org/content/suppl/2013/07/19/27.14.1545.DC1.html

References This article cites 28 articles, 10 of which can be accessed free at:
http://genesdev.cshlp.org/content/27/14/1545.full.html#ref-list-1

Open Access Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

Email Alerting Service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or **click here.**

To subscribe to *Genes & Development* go to:
http://genesdev.cshlp.org/subscriptions

Copyright © 2013 by Cold Spring Harbor Laboratory Press