Rôle de la nucléoline et de macroH2A dans la structure et la fonction du nucléole

Corinne Ivaldi

▶ **To cite this version:**

Corinne Ivaldi. Rôle de la nucléoline et de macroH2A dans la structure et la fonction du nucléole. Biochimie [q-bio.BM]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2007. Français. NNT : . tel-00145137

HAL Id: tel-00145137

https://theses.hal.science/tel-00145137

Submitted on 8 May 2007

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

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

N° d'ordre : 400
N° attribué par la bibliothèque : 07ENSL0 400

THESE

en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : sciences de la vie
Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule
Laboratoire Joliot Curie

Ecole doctorale de : Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 23/02/2007

par Mademoiselle Corinne Ivaldi

Titre :

RÔLE DE LA NUCLEOLINE ET DE MACROH2A DANS LA STRUCTURE ET LA FONCTION DU NUCLEOLE

Directeur de thèse : Philippe BOUVET

Co-encadrant : Christophe PLACE

Après avis de : Madame Fabienne HANS, Membre/Rapporteur

Monsieur Philippe PASERO, Membre/Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de **:**

Monsieur Philippe BOUVET, Membre

Monsieur Manuel ECHEVERRIA, Membre/Président

Madame Fabienne HANS, Membre/Rapporteur

Monsieur Philippe PASERO, Membre/Rapporteur

Monsieur Christophe PLACE, Membre

A Sébastien,

A mes parents,

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à **Sébastien Almagro,** mon compagnon, qui m'a soutenu sur tous les plans durant ces années de thèse. Je dédie aussi ce travail à **mes parents** qui m'ont permis d'effectuer mes études.

Je remercie **Philippe Bouvet**. Malgré les différends, nous y sommes arrivés. Je remercie aussi **Christophe Place** pour son encadrement et pour m'avoir fait découvrir le monde de la physique.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse **Fabienne Hans** et **Philippe Pasero** pour la rapidité avec laquelle ils ont lu le manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également au président du jury, **Manuel Echeverria**, qui a accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier **Iva Ugrinova** avec qui j'ai réalisé une partie de ce travail. Un grand merci à **Fabien Mongelard** et à **Sébastien Storck** pour leur aide précieuse. Merci à **Fabien Montel** pour m'avoir initié à l'analyse statistique. Je tiens à remercier **Chantal Bella** qui m'a tout appris sur la cytométrie. Je remercie également mes collègues **Dimitar Angelov**, **Mathieu Boulard**, **Hervé Ménoni**, **Emeline Fontaine** et **Cécile Doyen**. Un remerciement tout spécial à **Hélène Delage** qui m'a offert son hospitalité et à **Nicole «** Maggie » **Martinez** pour sa gentillesse envers moi. Je remercie tous les physiciens et notamment **Brice Juanico** et **Bertrand François** pour leur soutient mais aussi parce que se sont mes deux co-buros préférés. Je remercie également **Cendrine Moskalenko**, **Alain Arneodo**, **Françoise Argoul**.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ---- 3
TABLE DES MATIERES ---- 4
INDEX DES FIGURES ---- 7
INDEX DES TABLEAUX ---- 8
LISTE DES ABREVIATIONS ---- 9
RESUME ---- 10
SUMMARY ---- 11
Chapitre 1 : INTRODUCTION ---- 12
I) LE NUCLEOLE ---- 12
A) Organisation générale du nucléole ---- 12
1) Structure d'un nucléole ---- 12
2) Régions Organisatrices du Nucléole ---- 13
3) Les protéines nucléolaires ---- 14
4) La dynamique des protéines nucléolaires ---- 15
B) La biogenèse des ribosomes ---- 16
1) Les gènes ribosomiques ---- 16
a) Structure d'un gène ribosomique ---- 16
b) Organisation moléculaire des gènes ribosomiques ---- 18
2) Transcription des gènes ribosomiques ---- 19
a) Initiation de la transcription ---- 19
b) Terminaison de la transcription ---- 22
c) Spécificité d'espèces ---- 22
d) Régulation de la transcription ---- 23
i) Arrêt de la transcription au cours de la mitose ---- 23
ii) Répression des gènes ribosomiques ---- 24
3) De l'ARN pré-ribosomique aux ribosomes ---- 25
a) Lieu de synthèse des ARN pré-ribosomiques ---- 25
b) La dynamique des ARN ribosomiques ---- 26
c) Maturation de l'ARN pré-ribosomique ---- 26
i) Modification de l'ARN pré-ribosomique ---- 27
ii) Clivage de l'ARN pré-ribosomique ---- 27
d) Assemblage des ribosomes : utilisation des trois machineries de transcription 27
II) LA NUCLEOLINE ---- 29
A) Structure de la nucléoline ---- 29
1) Structure primaire ---- 29
2) Structure tertiaire ---- 30
B) Fonction de la nucléoline ---- 32
1) Localisation de la nucléoline au sein du nucléole ---- 32
2) Rôle de la nucléoline dans la synthèse des ribosomes ---- 33
a) Rôle dans la transcription Pol I ---- 33
b) Rôle de chaperonne d'ARN de la nucléoline ---- 34
i) Elément de reconnaissance de la nucléoline ---- 34
ii) Repliement « exact » de l'ARN pré-ribosomique ---- 35
c) Clivage précoce et assemblage des ribosomes ---- 37
3) Les autres fonctions de la nucléoline ---- 37

a) Rôle dans la transcription Pol II ---- 37
b) La nucléoline et la réponse à un stress ---- 38
c) La réparation, la recombinaison et la réplication ---- 38
d) La nucléoline est une chaperonne d'histone ---- 39
III) LA CHROMATINE ---- 39
A) Composition et structure de la chromatine ---- 39
1) Le nucléosome ---- 40
a) Les histones conventionnelles ---- 41
b) Les variants d'histone ---- 41
i) H2A.X et H2A.Z ---- 41
ii) MacroH2A ---- 42
iii) H2A-Bbd ---- 43
2) Organisation de la chromatine ---- 44
a) Les niveaux de compaction de la chromatine ---- 44
b) Hétérochromatine et euchromatine ---- 46
c) Les territoires chromosomiques ---- 47
B) Les fonctions de la chromatine ---- 49
1) Régulation par la compaction de la chromatine ---- 49
2) Régulation par les modifications d'histones ---- 49
a) Rôle de l'acétylation ---- 50
b) Rôle de la méthylation ---- 51
c) Les autres modifications d'histone ---- 53
3) Régulation par les variants d'histone ---- 54
4) Le code histone ---- 55
5) Régulation par des complexes de remodelage ---- 57
OBJECTIFS ---- 59
Chapitre 2 : RESULTATS ---- 61
I) Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish. ---- 62
PUBLICATION ---- 63
II) Localisation d'histones variants et de modifications d'histone sur une fibre de chromatine peignée. ---- 70
A) Visualisation d'une fibre de chromatine étirée ---- 72
B) Visualisation des variants et des modifications d'histones ---- 74
1) Choix du marquage des histones visualisées ---- 74
2) Détection des variants d'histone le long de la fibre étirée ---- 74
a) Observation de H2A-GFP ---- 74
b) Observation des variants de H2A ---- 76
i) Observation de l'histone MacroH2A-GFP ---- 76
ii) Observation de l'histone H2A-Bbd-GFP ---- 77
3) Observation des modifications d'histones ---- 77
a) Observation de la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 ---- 77
b) Observation de l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 ---- 78
C) Répartition spatiale des variants et des modifications d'histone. ---- 79
1) Evaluation de la distance entre deux points successifs ---- 79
2) L'autocorrélation ---- 81
D) Co-localisation entre variants d'histone et histones modifiées ---- 83
1) MacroH2A-GFP et la 3MeK9H3 ---- 83
2) H2A-Bbd-GFP et la 3MeK9H3 ---- 84
3) H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4 ---- 85

4) Analyse de la colocalisation par une méthode statistique ---- 86
III) Rôle de la nucléoline dans la structure du nucléole et dans la prolifération des cellules ---- 89
A) Inhibition de la nucléoline par ARN interférant ---- 89
B) La nucléoline est nécessaire à la structure du nucléole ---- 91
C) La nucléoline a un rôle important dans la synthèse du pré-ARNr ---- 93
D) L'absence de nucléoline provoque une perturbation du cycle cellulaire ---- 95
E) L'absence de nucléoline provoque l'apoptose des cellules ---- 97
Chapitre 3 : DISCUSSION ---- 101
A) MacroH2A : régulateur de l'expression des gènes ---- 101
1) Présence de macroH2A dans des zones précises de la chromatine ---- 102
2) Influence sur la transcription ---- 103
B) Rôle de la nucléoline dans la régulation de la transcription des gènes ribosomiques ---- 105
1) La nucléoline est indispensable à la vie cellulaire ---- 105
2) Perturbation de la transcription et de la structure du nucléole ---- 105
3) La nucléoline et la réponse à un stress ---- 106
C) Mécanisme de régulation des gènes ribosomiques ---- 107
CONCLUSIONS ---- 109
Chapitre 4 : MATERIELS ET METHODES ---- 110
I) Visualisation des variants et des modifications d'histones sur une fibre de chromatine étirée ---- 110
A) Matériels utilisés ---- 110
1) Cellules ---- 110
2) Plasmides ---- 110
3) Anticorps ---- 110
B) Transfection des cellules ---- 110
C) Etirement de la chromatine ---- 111
1) Traitement des surfaces par la polylysine ---- 111
2) Récupération des cellules et fixation sur une lame de verre ---- 111
3) Obtention de la chromatine étirée ---- 111
4) Incubation des anticorps ---- 112
5) Acquisition des images ---- 112
II) Inhibition de l'expression de la nucléoline par ARN interférant ---- 113
A) Matériels utilisés ---- 113
1) Cellules ---- 113
2) ARN interférants ---- 113
3) Anticorps ---- 114
B) Transfection des cellules ---- 114
C) Western blot ---- 115
D) Immunofluorescence ---- 115
E) Extraction d'ARN et PCR en temps réel ---- 116
F) Northern blot ---- 116
G) Analyse du cycle cellulaire ---- 117
H) Détection de l'apoptose ---- 117
Chapitre 5 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---- 119
ANNEXE ---- 139
I) Programme de calcul des distances entre deux points successifs ---- 139
II) Programme de calcul de l'autocorrélation et de la corrélation croisée ---- 141

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'un nucléole de cellule HeLa vue par microscopie électronique. ------- 13
Figure 2 : Les différentes classes de protéines du nucléole. ---------- 15
Figure 3 : Représentation schématique d'un gène ribosomique. ---------- 17
Figure 4 : Représentation schématique de l'ARN pré-ribosomique. ---------- 18
Figure 5 : Organisation des gènes ribosomiques en arbre de Noël. ---------- 19
Figure 6 : Initiation de la transcription. ---------- 21
Figure 7 : Les trois sites possibles de la transcription. ---------- 25
Figure 8 : Les trois machineries de transcription. ---------- 28
Figure 9 : Représentation schématique de la nucléoline. ---------- 30
Figure 10 : modèle en ruban des RBD 1 et 2 de la nucléoline. ---------- 31
Figure 11 : Comparaison de séquence des RDB 1 et 2 de différentes espèces. ---------- 32
Figure 12 : Structure du complexe RBD 1,2-NRE par RMN. ---------- 35
Figure 13 : Modèle représentant l'activité de chaperonne de la nucléoline. ---------- 36
Figure 14 : Structure cristallographique de la particule de cœur d'un nucléosome à 2,8 Å. -- 40
Figure 15 : Localisation par microscopie de fluorescence de macroH2A au sein de cellule en métaphase. ---------- 43
Figure 16 : Localisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd au sein du noyau de cellule interphasique. ---------- 44
Figure 17 : Cliché de microscopie électronique du nucléofilament. ---------- 45
Figure 18 : Les niveaux de compaction de la chromatine. ---------- 46
Figure 19 : Noyau d'une cellule eucaryote en interphase vu par microscopie électronique. - 47
Figure 20 : Organisation de la chromatine en territoires chromosomiques d'un fibroblaste de poulet. ---------- 48
Figure 21: Localisation des 4 principales modifications d'histones. ---------- 50
Figure 22 : Acétylation des histones sur les résidus lysine. ---------- 51
Figure 23 : La lysine et l'arginine peuvent être méthylées. ---------- 52
Figure 24 : Relation entre les différentes modifications. ---------- 56
Figure 25 : Déplacement des nucléosomes par les complexes de remodelage. ---------- 58
Figure 26 : Visualisation par microscopie de fluorescence de la chromatine de cellules HeLa peignée sur une surface de verre traitée. ---------- 73
Figure 27 : Observation par microscopie de fluorescence de H2A-GFP. ---------- 75
Figure 28 : Visualisation de macroH2A-GFP sur une fibre de chromatine. ---------- 76
Figure 29 : Observation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP. ---------- 77
Figure 30 : Visualisation par microscopie de fluorescence de la 3MeK9H3 sur une fibre de chromatine étirée. ---------- 78
Figure 31 : Observation par microscopie de fluorescence de l'AcK12H4. ---------- 79
Figure 32 : Distance entre deux points lumineux successifs. ---------- 80
Figure 33 : Autocorrélation pour macroH2A-GFP, la 3MeK9H3, H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4. ---------- 82
Figure 34 : visualisation par microscopie de fluorescence de macroH2A-GFP et de la 3MeK9H3 simultanément. ---------- 84
Figure 35 : visualisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP et de la 3MeK9H3 simultanément. ---------- 85
Figure 36 : Visualisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP et de l'AcK12H4 simultanément. ---------- 86
Figure 37 : Corrélation croisée entre variant et modification. ---------- 87
Figure 38 : Inhibition de la nucléoline par ARN interférant. ---------- 90

Figure 39 : L'inhibition de la nucléoline entraîne une modification de la structure du nucléole. ---------- 92
Figure 40 : L'inhibition de la nucléoline entraîne une diminution de la synthèse du pré-ARNr 45S.---------- 94
Figure 41 : La nucléoline a un rôle dans la prolifération des cellules.---------- 96
Figure 42 : L'absence de nucléoline provoque l'induction de l'apoptose.---------- 99
Figure 43 : Principe de l'étirement de la chromatine. ---------- 112

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Calcul de la moyenne et de l'écart type des distances---------- 81
Tableau 2 : Fluorophore, filtre et temps d'acquisition utilisés pour les expériences d'étirement de la chromatine.---------- 113
Tableau 3 : Caractéristique des deux siRNA utilisés. ---------- 114
Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les western blot et l'immunofluorescence.---------- 114
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour l'expérience de RT-PCR.---------- 116

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNr : ADN ribosomique
AFM : microscopie de force atomique
ARN : acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomique
Br-UTP : bromouridine-triphosphate
CPE : Core Promoter Element
C-terminal : Carboxy-terminal
DAPI : 4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DFC : composant fibrillaire dense
ECM : Evolutionary Conserve Motif
ETS : séquence transcrite externe
FC : centre fibrillaire
GC : composant granulaire
GFP : Green Fluorescent Protein
HAT : Histone AcétylTransférase
HDAC : Histone Déacétylase
HP1 : protéine de l'hétérochromatine 1
IGS ; séquence intergénique
ITS : séquence transcrite interne
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
NHR : région non histone
NLS : site de localisation nucléaire
NOR : région organisation du nucléole
NoRC : complexe de remodelage nucléolaire
NRE : élément de reconnaissance de la nucléoline
N-terminal : Amino-terminal
PIC : complexe de pré initiation
PNB : Corps prénucléolaire
Pol I, II, III : ARN polymérase I, II, III
Pré-ARNr : ARN pré-ribosomique
PTRF : Pol I and Transcrit release factor
RBD : DNA Binding Domain
RRM : RNA Recognition Motif
SL1 : selective factor 1
siRNA : small interferent RNA
snoRNA : Small Nucleolar RNA
snoRNP : Small nucleolar ribonucleoprotein
TAF : TBP Associated factor
TBP : TATA Binding Protein
TIP-5 : TTF-1 interacting protein 5
TTF-1 : facteur de terminaison de la transcription 1
UBF : Upstream Binding Factor
UCE : Upstream Control Element

RESUME

Le nucléole est le lieu où débute la synthèse des ribosomes. Sa structure est fortement corrélée à la transcription des gènes ribosomiques. La régulation de l'expression des gènes ribosomiques est une étape importante de la biogenèse des ribosomes. L'objectif de ce travail a été de définir et d'ouvrir des voies méthodologiques pour mettre en évidence le rôle de macroH2A et de la nucléoline dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques. MacroH2A est pour l'instant le seul variant d'histone présent dans le nucléole. La nucléoline est une des protéines majoritaires du nucléole. La première partie de notre étude a porté sur un système cellulaire original celui de la carpe dont l'adaptation aux conditions climatiques (hiver et été) requiert des changements importants dans l'expression génique. Ainsi la répression de l'expression des ARN ribosomiques, associée à une baisse d'activité cellulaire, est concomitante avec *(i)* une déstructuration du nucléole, *(ii)* une augmentation de la concentration de macroH2A et de la nucléoline et *(iii)* une augmentation de la méthylation d'îlots CpG. Il existe donc une corrélation entre l'expression des gènes ribosomiques et le niveau d'expression de macroH2A. Pour analyser la distribution de macroH2A sur une fibre de chromatine, nous avons utilisé la technique d'étirement de la chromatine. Nous avons montré que macroH2A co-localise avec la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 qui est un marqueur de l'hétérochromatine. De plus, la distribution de macroH2A est périodique suggérant un rôle de cette histone dans une organisation particulière de la chromatine. Enfin, nous avons développé au laboratoire un système cellulaire reposant sur l'inhibition de la nucléoline par RNAi dans des cellules HeLa. Les conséquences de l'inhibition de la nucléoline sont multiples : une diminution de la synthèse de l'ARN pré-ribosomique accompagnée d'une perturbation de la structure du nucléole et d'un arrêt du cycle cellulaire en mitose pouvant conduire à l'apoptose. La nucléoline est donc largement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques.

SUMMARY

Ribosome synthesis starts in the nucleolus. The nucleolus structure is strongly influenced by ribosomal genes transcription. Ribosomal gene regulation is crucial for ribosome synthesis. The aim of this work was to define and open new methodological ways to characterize the role of macroH2A and nucleolin in the regulation of ribosomal genes expression. To date, MacroH2A is the only histone variant present in the nucleolus. Nucleolin is one of the major proteins of the nucleolus. The first part of this study is focused on the common carp, an original biological system, that adapts to temperature condition (winter and summer) by adjusting is gene expression. The results show that repression of ribosomal RNA expression, associated with a decrease of cellular activity, is concomitant with (*i*) nucleolar rearrangements, (*ii*) increase of macroH2A and nucleolin concentration and (*iii*) increase of DNA CpG methylation. Ribosomal genes expression appears to be linked to the level of macroH2A. To analyse the distribution of macroH2A on chromatin, we developed experiments based on extended chromatin fibers. We show that macroH2A colocalize with trimethylation of lysine 9 of H3, that is a marker of heterochromatin. Moreover, distribution of macroH2A is periodic, suggesting a role of this histone variant in a special chromatin organization. Finally, in the laboratory, we developed a cellular system based on nucleolin inhibition by RNA interference in HeLa cells. Two main results have emerged from the knockdown of nucleolin: decrease of pre-ribosomal RNA synthesis associated with nucleolar structure disruption and cell cycle arrest in mitosis leading to apoptosis. Thus, nucleolin is strongly implicated in the regulation of ribosomal genes expression.

Chapitre 1 : INTRODUCTION

I) LE NUCLEOLE

Le nucléole est une structure dense aux électrons présente à l'intérieur du noyau des cellules eucaryotes. Ces noyaux peuvent contenir un ou plusieurs nucléoles. Dès le XVIIIe siècle, le nucléole a été observé et décrit comme un "corps oviforme" dans des cellules épidermiques d'anguille. Le terme de nucléole fut introduit par Valentin en 1836 (Mosgoeller, 2004).

Dans ce chapitre, je vais présenter l'organisation générale du nucléole. Ensuite, nous verrons les différentes fonctions du nucléole et plus particulièrement la biogenèse des ribosomes.

A) Organisation générale du nucléole

1) Structure d'un nucléole

Le nucléole est un organite visible en microscopie par contraste de phase. Il n'existe pas de membrane qui sépare le nucléole du nucléoplasme. Les nucléoles sont localisés le plus souvent près de l'enveloppe nucléaire (Bourgeois *et al.*, 1988). Il est organisé en trois composants majeurs visibles en microscopie électronique (Hernandez-Verdun *et al.*, 2004) (**figure 1**). Le premier composant est le centre fibrillaire (Fibrillar Center ou FC). Ce sont des régions claires dont la taille varie entre 0,1 et 1 μm. Les nucléoles de différents types cellulaires présentent des centres fibrillaires dont le nombre et la taille sont variables (Hozak *et al.*, 1989). Les centres fibrillaires sont entourés par un deuxième composant ayant un aspect contrasté, ce qui lui a valu son nom de composant fibrillaire dense (Dense Fibrillar Component ou DFC). Ces deux structures sont entourées par un troisième composant, le composant granulaire (Granular Component ou GC) constitué de granules ayant une taille comprise entre 15 et 20 nm.

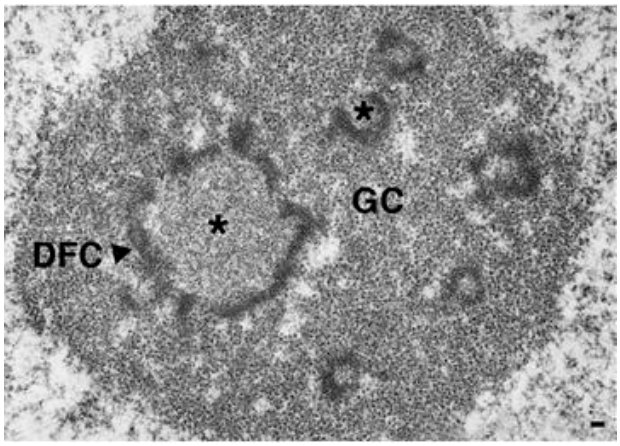

Figure 1 *: Structure d'un nucléole de cellule HeLa vue par microscopie électronique. Les centres fibrillaires (astérisques), dont la taille est variable, sont entourés par les composants fibrillaires denses (DFC). Ces deux structures sont enveloppées par les composants granulaires (GC). La barre représente 0,1 µm. D'après (Hernandez-Verdun, 2006).*

La taille et la forme des nucléoles varient au sein d'une même cellule mais aussi en fonction du type cellulaire. Dans des cellules humaines, la taille du nucléole varie de 0,5 µm pour des lymphocytes matures et jusqu'à 3 à 9 µm pour des cellules en prolifération et/ou cancéreuses (Hernandez-Verdun, 2006).

2) Régions Organisatrices du Nucléole

Chez l'homme, les gènes ribosomiques sont localisés dans les bras courts des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (Henderson *et al.*, 1972). Ces chromosomes sont acrocentriques, c'est-à-dire que le centromère est localisé proche d'une extrémité du chromosome. Les régions chromosomiques où sont situés les gènes ribosomiques sont nommées régions organisatrices du nucléole (Nucleolus Organizer Region ou NOR) (Comai, 1999). Un groupe particulier de protéines est localisé au niveau de ces régions. Ce sont des protéines nucléolaires argyrophiliques (sensible à la coloration par l'argent) appelées protéines AgNOR. Elles permettent de visualiser les NOR de façon rapide et claire par une coloration à l'argent (Goodpasture *et al.*, 1975). Dans les noyaux interphasiques, le marquage des protéines AgNOR apparaît sous forme de granules noirs localisés dans le nucléole. L'intensité du marquage dépend de l'activité des gènes ribosomiques (Hubbell, 1985). Il a été

suggéré que la quantité de protéines AgNOR est reliée à la prolifération cellulaire (Derenzini *et al.*, 1990; Trere *et al.*, 1989). Certaines de ces protéines servent de marqueur de la prolifération cellulaire pour le diagnostic de certains cancers humains (Derenzini *et al.*, 1995). Roussel *et al.* ont identifié deux protéines trouvées majoritairement dans le nucléole, la nucléoline et la nucléophosmine (protéine B23) comme protéines AgNOR (Roussel *et al.*, 1992 ; Roussel *et al.*, 1994b). Des sous-unités de l'ARN Polymérase I (Pol I) ainsi que le facteur de transcription UBF ont également été identifiés comme des protéines AgNOR (Roussel *et al.*, 1994a).

3) Les protéines nucléolaires

Les protéines présentes dans le nucléole ont été déterminées par spectrométrie de masse. En 2002, Andersen *et al.* montrent que chez l'homme, il existe 271 protéines nucléolaires (Andersen *et al.*, 2002). Au cours de la même année et en utilisant la même méthode, Scherl *et al.* identifient 213 protéines nucléolaires (Scherl *et al.*, 2002). En déterminant les protéines communes aux deux études et celles qui ne le sont pas, environ 350 protéines sont présentes dans les nucléoles humains (Scherl *et al.*, 2002). En 2005, une nouvelle analyse montre qu'il y a 489 protéines nucléolaires et que le protéome du nucléole varie en fonction des conditions cellulaires (Andersen *et al.*, 2005) (**figure 2**). Récemment, il a été montré que le nucléole peut contenir jusqu'à environ 700 protéines (Coute *et al.*, 2006).

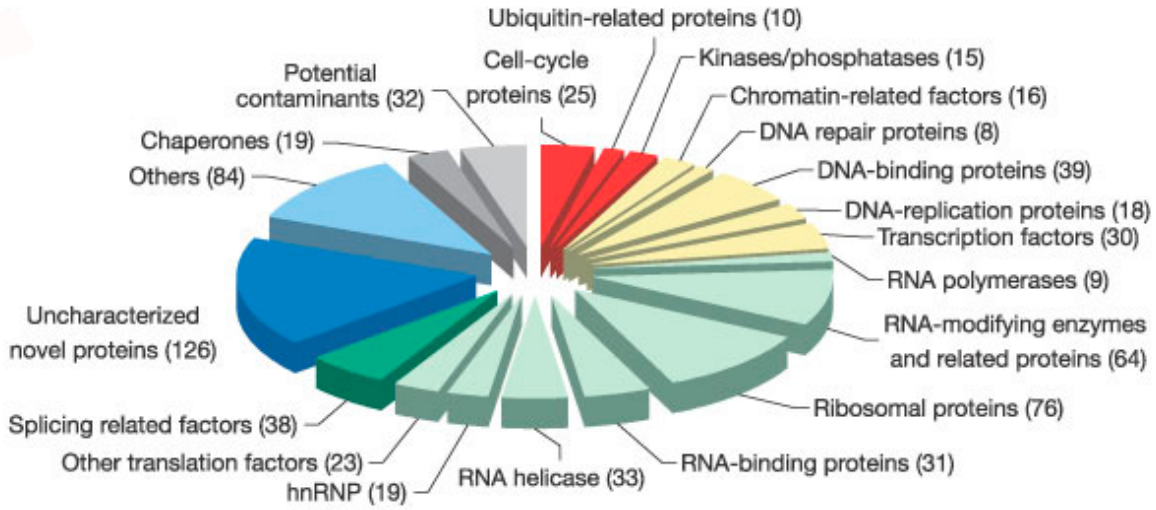

Figure 2 : *Les différentes classes de protéines du nucléole.*
Les protéines sont classées par fonction. Le numéro indique le nombre de protéines pour chaque catégorie. D'après (Andersen et al., 2005).

4) La dynamique des protéines nucléolaires

Pour étudier la dynamique des protéines, la technique de « retour » de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching ou FRAP) est utilisée. Cette technique permet de mesurer la diffusion des protéines fluorescentes dans les cellules. Il a été montré par cette méthode que le complexe Pol I est dynamique (Dundr *et al.*, 2002). Les auteurs montrent que les composants du complexe Pol I se déplacent rapidement entre le nucléole et le nucléoplasme. Ils montrent également que les sous-unités de Pol I sont séparées lorsqu'elles entrent dans le nucléole et non assemblées en complexe. L'échange rapide entre le nucléole et le nucléoplasme de la majorité des composants de Pol I suggère que le complexe Pol I n'est pas recyclé après la terminaison de la transcription mais ré-assemblé à chaque transcription (Aprikian *et al.*, 2001). En utilisant la même technique, Chen *et al.* montrent que le facteur UBF se déplace rapidement entre le nucléole et le nucléoplasme (Chen *et al.*, 2001). Aussi, la fibrillarine, la nucléoline et la protéine B23 se déplacent entre le nucléole et le nucléoplasme de façon rapide (Chen *et al.*, 2001; Phair *et al.*, 2000). Une inhibition de la transcription Pol I n'empêche pas le mouvement de ces protéines (Chen *et al.*, 2001). Chen *et al.* montrent également que les protéines ribosomiques S5 et L9 se déplacent plus lentement et ont un temps de résidence important dans le nucléole (Chen *et al.*, 2001). S5 fait partie de la petite sous-unité du ribosome alors que L9 fait partie de la grande sous-unité.

Le nucléole est donc une structure très dynamique. Il existe une relation entre l'organisation et la fonction du nucléole. Il a été montré que lorsque l'activité fonctionnelle du nucléole est faible, celui-ci a une petite taille. En revanche, lorsque la cellule est stimulée, le nucléole ainsi que les composants fibrillaires denses deviennent plus gros (Raska *et al.*, 2004). De plus, le nombre de centres fibrillaires varie en fonction de l'activité du nucléole. Leur nombre est deux fois plus important en phase G2 qu'en phase G1 (Hernandez-Verdun, 2006). Le nucléole intervient dans de nombreuses fonctions biologiques comme la prolifération, la croissance, le cycle cellulaire, la sénescence ou encore la réponse à un stress. Il est le lieu où débute la synthèse des ribosomes.

B) La biogenèse des ribosomes

C'est dans les années 1960 que le nucléole a été associé à la synthèse des ribosomes. En effet, diverses observations ont permis d'impliquer le nucléole dans la synthèse des ribosomes et dans la formation d'ARN ribosomiques (Ritossa *et al.*, 1965). Ces ARN ribosomiques sont issus de la transcription des gènes ribosomiques qui possèdent une structure particulière.

1) Les gènes ribosomiques

a) Structure d'un gène ribosomique

Le génome diploïde humain contient environ 400 copies d'un même gène ribosomique. Ces copies sont localisées dans le composant fibrillaire dense (Wachtler *et al.*, 1992). Les gènes ribosomiques sont répétés les uns à la suite des autres et ne possèdent pas tous la même orientation (Caburet *et al.*, 2005).

Un gène ribosomique se divise en deux parties : la première partie correspond à une séquence nucléotidique non transcrite nommée « espaceur intergénique » (Intergenic Spacer ou IGS), la seconde code pour l'ARN pré-ribosomique (pré-ARNr) qui correspond aux trois ARN ribosomiques (ARNr) 18S, 5.8S et 28S (**figure 3**). L'IGS correspond à 30 kilobases (kb) environ et est constitué d'un promoteur proximal et d'un promoteur distal. Le promoteur proximal est composé de deux domaines distincts. Le premier domaine (Core Promoter Element ou CPE) est situé en amont de la partie codante. Il est nécessaire et suffisant pour

permettre une initiation de la transcription *in vitro*. Situé en amont du premier domaine, le deuxième domaine (Upstream Control Element ou UCE) n'est pas nécessaire la transcription. Chez la souris, il permet toutefois de la stimuler de façon remarquable *in vivo* et *in vitro* (Henderson *et al.*, 1990). En amont du domaine UCE se trouve le site de terminaison T_0. Dix sites de terminaison notés T_1 à T_{10} sont présents en aval du gène ribosomique. Le promoteur distal situé en amont du promoteur proximal a une activité plus réduite par rapport au promoteur proximal (Kuhn *et al.*, 1987). Le rôle exact de ce promoteur n'est pas encore clairement établi. Des séquences activatrices de la transcription appelées « enhancers » sont présentes entre le promoteur distal et le site T_0. Ces enhancers stimulent la transcription du promoteur proximal *in vivo* et *in vitro* (Kuhn *et al.*, 1990).

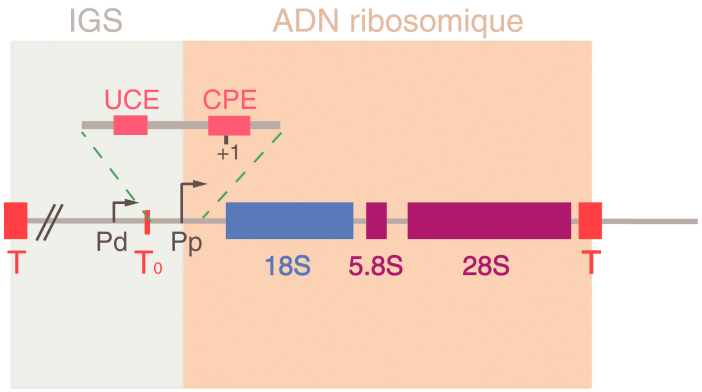

Figure 3 : *Représentation schématique d'un gène ribosomique.*
Le gène se compose de deux parties : la partie IGS et la partie codant pour les trois ARN ribosomiques (18S, 5.8S et 28S). La partie IGS est constituée de deux promoteurs : le promoteur proximal (Pp) et le promoteur distal (Pd). Le promoteur proximal contient un domaine UCE et un domaine CPE où se situe le site +1 d'initiation de la transcription. Un site de terminaison T_0 se situe en amont du domaine UCE. Dix sites de terminaison (T) se situent en aval du gène ribosomique. Adapté de (Russell et al., 2005).

La seconde partie de 13 kb code pour les ARNr 18S, 5.8S et 28S. Les régions d'ADN ribosomiques (ADNr) correspondant aux ARNr sont séparées par des séquences transcrites appelées « espaceurs intragéniques transcrits » (**figure 4**). Il existe deux types d'espaceur : les espaceurs transcrits externes (External Transcribed Spacer ou ETS) et les espaceurs transcrits internes (Internal Transcribed Spacer ou ITS). Deux ETS se situent aux extrémités 5' et 3' de

la partie codante. Les ITS 1 et 2 sont localisés entre la séquence correspondant au 18S et au 5.8S et, entre la séquence correspondant au 5.8S et au 28S respectivement.

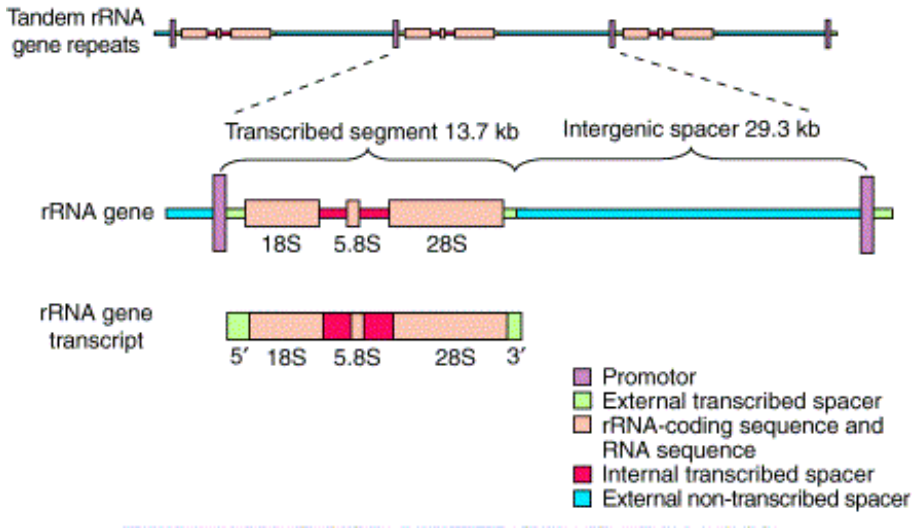

Figure 4 : *Représentation schématique de l'ARN pré-ribosomique.*
Le pré-ARNr se compose des ARNr 18S, 5.8S et 28S séparés par des séquences transcrites internes (ITS). Des séquences transcrites externes (ETS) se situent à chaque extrémité du pré-ARNr. D'après (Raska, 2003).

b) Organisation moléculaire des gènes ribosomiques

L'organisation moléculaire des gènes ribosomiques actifs a été observée pour la première fois par Miller et Beatty en 1969 (Miller *et al.*, 1969). A partir de nucléoles extraits d'oocytes d'amphibiens, ils montrent que les gènes en cours de transcription se présentent sous la forme d'une structure ressemblant à un « arbre de Noël » (**figure 5**).

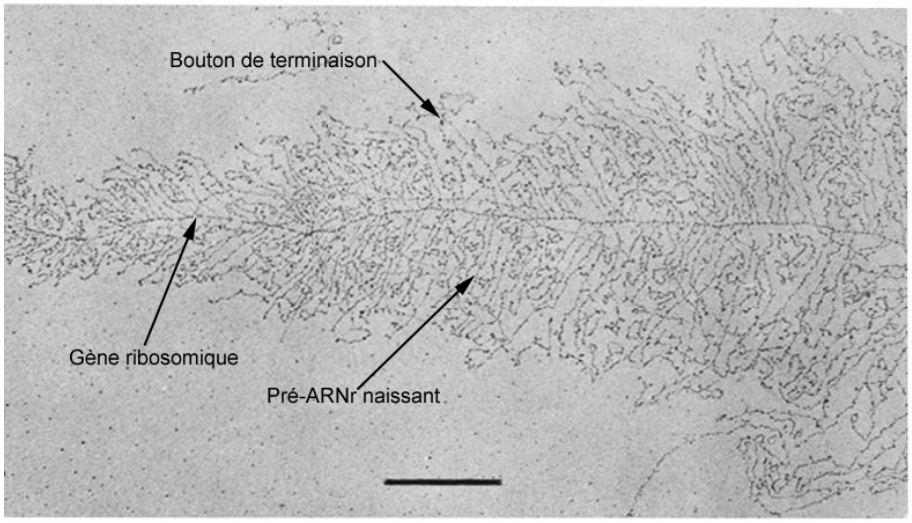

Figure 5 : *Organisation des gènes ribosomiques en arbre de Noël.*
Gènes ribosomiques issus d'oocyte de triton. Le tronc de l'arbre représente le gène ribosomique. Les branches correspondent aux pré-ARNr naissants. La différence de longueur des pré-ARNr résulte de la progression de la transcription. Des boutons de terminaison sont présents à l'extrémité 5' des ARN. La barre correspond à 1 µm. Adapté de (Miller, 1981).

Le tronc de l'arbre de Noël correspond au gène ribosomique. Les branches représentent les pré-ARNr naissants. La différence de longueur des pré-ARNr reflète la progression de l'élongation de la transcription. Au niveau de leur extrémité 5', les pré-ARNr naissants possèdent une boule noire nommée « bouton de terminaison » (terminal knob). Ces boutons de terminaison semblent correspondre à des complexes impliqués dans la maturation des pré-ARNr (Dragon *et al.*, 2002; Mougey *et al.*, 1993). La visualisation des gènes transcrits est possible car beaucoup de molécules sont synthétisées simultanément sur chaque gène. Cette structure a également été observée dans d'autres espèces comme les mammifères et la levure. (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1977 ; Raska *et al.*, 2004; Scheer *et al.*, 1990).

2) Transcription des gènes ribosomiques

a) Initiation de la transcription

La transcription commence par le recrutement et l'assemblage du complexe Pol I avec d'autres facteurs de transcription (Russell *et al.*, 2005). Cet assemblage forme le

complexe de pré-initiation (pre-initiation complexe ou PIC) qui s'associe au promoteur des gènes ribosomiques (**figure 6**).

Les facteurs SL1 (Selective Factor 1) et UBF (Upstream Binding Factor) qui se dimérisent se lient à l'ADN au niveau des domaines CPE et UCE du promoteur des gènes ribosomiques. Le complexe humain SL1 (TIF-IB chez la souris) contient la protéine TBP (TATA-box-binding protein) et trois sous-unités TAF_I48 et TAF_I63 et TAF_I110 (TBP associated factors) (Comai *et al.*, 1992). SL1 interagit avec la partie C-terminale hautement acide de UBF (Tuan *et al.*, 1999). Cette interaction pourrait impliquer les sous-unités TAF_I48 et TBP de SL1 (Beckmann *et al.*, 1995). L'interaction entre UBF et SL1 est importante pour la stabilisation de UBF sur le promoteur des gènes ribosomiques (Friedrich *et al.*, 2005). De façon surprenante, le site T_0 situé en amont du promoteur proximal des gènes ribosomiques est impliqué dans l'initiation de la transcription alors que les sites T_1 à T_{10} sont impliqués dans la terminaison de la transcription. Le site T_0 est le site de liaison du facteur de terminaison de la transcription TTF-1 (transcription Terminator Factor 1). Ce facteur interagit avec l'histone acétyltransférase PCAF (p300/CBP associated factor) qui peut acétyler la sous-unité TAF_I63 de SL1, augmentant ainsi la liaison de cette sous-unité et donc de SL1 avec le promoteur de l'ADNr (Muth *et al.*, 2001).

Miller *et al.* montrent que SL1 se lie par l'intermédiaire de ces sous-unités TAF_I63 et TAF_I110 au facteur hRRN3 (Miller *et al.*, 2001). Cette interaction est essentielle pour le recrutement de Pol I par SL1 sur le promoteur des gènes ribosomiques. En effet, Pol I s'associe à hRRN3 (Miller *et al.*, 2001). Ce facteur présente une grande homologie avec le facteur RRN3 de la levure (Moorefield *et al.*, 2000). Peyroche *et al.* montrent chez la levure que la sous-unité A43 de Pol I interagit avec le facteur RRN3 (Peyroche *et al.*, 2000). La conservation de A43 et de RRN3 de la levure à l'homme suggère que le mécanisme impliqué dans le recrutement de Pol I sur le promoteur des ADNr est conservé chez les eucaryotes supérieurs.

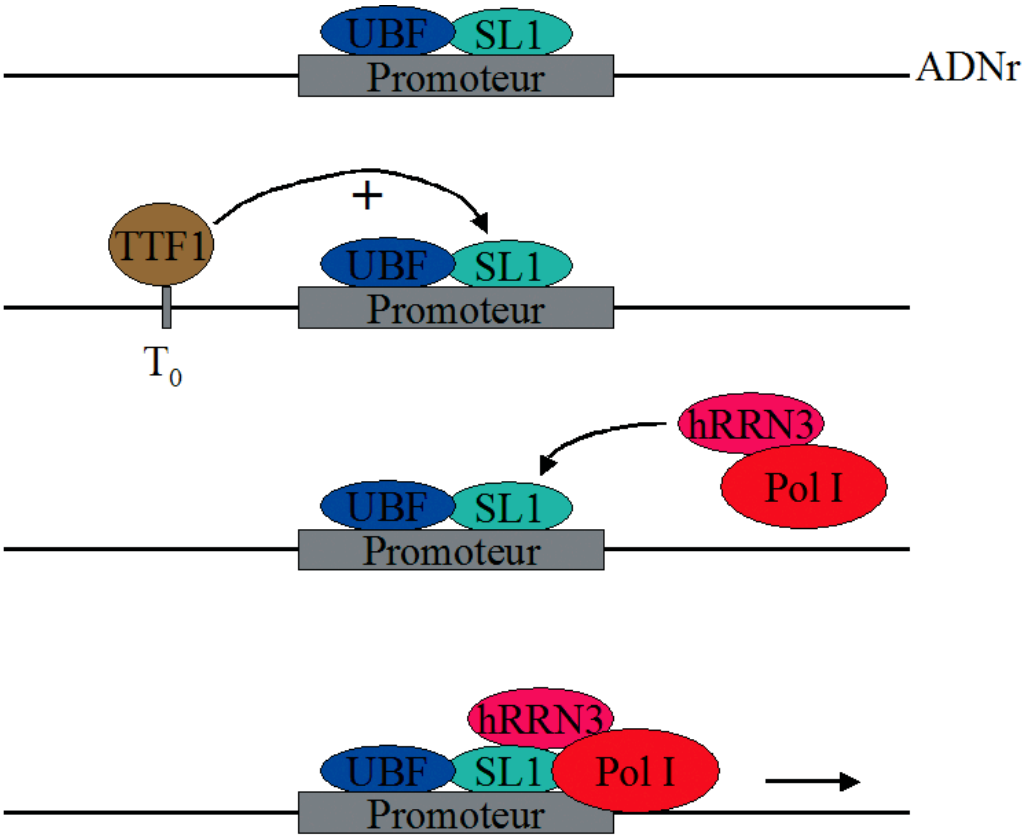

Figure 6 *: Initiation de la transcription.*
Le complexe de pré-initiation (PIC) se forme via des interactions entre différents facteurs. SL1 et UBF se lient au promoteur de l'ADNr. TTF-1, fixé sur le site T_0, augmente la liaison de SL1 au promoteur SL1 interagit avec le facteur hRRN3 qui interagit avec Pol I. Le trait noir représente l'ADNr.

Le facteur UBF n'interagit pas seulement avec SL1. En effet, il a été montré chez la souris que UBF interagit avec une des sous-unités de Pol I nommées hPAF53 (Hanada *et al.*, 1996). En 2006, Panov *et al.* montrent chez l'homme qu'une autre sous-unité de Pol I, PAF49, interagit avec UBF (Panov *et al.*, 2006). Ces données montrent la grande complexité de la transcription des gènes ribosomiques. La recherche est toujours très active dans ce domaine dans le but de caractériser les interactions ADN-protéine et protéine-protéine impliquées dans le complexe de pré-initiation de la transcription.

Un autre facteur nommé TIF-IC chez la souris a un rôle important dans la formation du complexe de transcription en interagissant avec Pol I (Schnapp *et al.*, 1994). Une fois la transcription initiée, la Pol I synthétise le pré-ARNr. C'est l'étape d'élongation. TIF-IC joue

également un rôle dans l'élongation de la transcription. En effet, Schnapp *et al.* montrent que TIF-IC stimule l'élongation et supprime les pauses de Pol I (Schnapp *et al.*, 1994). Lorsque l'élongation est terminée, des facteurs interviennent pour finaliser la transcription.

b) Terminaison de la transcription

La terminaison de la transcription des gènes ribosomiques s'effectue au niveau des sites de terminaison T_1 à T_{10} situés en aval du gène ribosomique. Cette terminaison implique le facteur TTF-1 mais aussi le facteur PTRF (Pol I and Transcrit Release Factor). Chez la souris, un modèle pour le mécanisme de terminaison a été élaboré. L'arrêt de la transcription des ADNr s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, TTF-1 se lie au site de terminaison provoquant un arrêt de l'élongation de l'ARN Polymérase I (Evers *et al.*, 1995a ; Evers *et al.*, 1995b). Ensuite, PTRF interagit avec la partie C-terminale de TTF-1 et avec Pol I (Jansa *et al.*, 1998). Le facteur PTRF induit la terminaison de la transcription, la dissociation de l'ARN Polymérase I et du transcrit de la matrice (Jansa *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 1997). Jansa *et al.* ont montré que PTRF et TTF-1 peuvent stimuler la réinitiation de la transcription (Jansa *et al.*, 2001). Ils suggèrent que PTRF puisse provoquer l'initiation d'une nouvelle transcription sur le promoteur suivant. Il existe une forte homologie entre les protéines murines et humaines. En effet, le facteur PTRF de souris présente 94 % d'homologie avec la protéine humaine (Jansa *et al.*, 1998). Cela suggère que le mécanisme de terminaison de la transcription est conservé d'une espèce à l'autre.

c) Spécificité d'espèces

Contrairement à la transcription par Pol II et III, la transcription par Pol I est spécifique d'espèces bien que la plupart des mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription soient conservés d'une espèce à l'autre. L'incompatibilité entre les différentes espèces a été observée dans des extraits cellulaires. En effet, un extrait cellulaire humain capable de transcrire l'ADNr humain *in vitro* est incapable de transcrire l'ADNr de souris. Il a été proposé que le facteur SL1 soit le facteur impliqué dans la spécificité d'espèce (Comai, 2004). Il a été montré également que l'élément terminateur du gène ribosomique de la souris est reconnu par le facteur TTF-1 de la souris et de l'homme. En revanche, l'élément terminateur du gène humain n'est pas reconnu par le facteur TTF-1 de la souris.

d) Régulation de la transcription

i) Arrêt de la transcription au cours de la mitose

La transcription des gènes ribosomiques débute pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Elle est importante pendant la phase de réplication de l'ADN (phase S) et pendant la phase G2. Aucun ARNr nouvellement transcrit n'est détecté en mitose (Weisenberger *et al.*, 1995). Il existe donc un système de régulation de la transcription des gènes ribosomiques en fonction du cycle cellulaire.

Le nucléole est présent pendant les phases G1, S et G2. Il se dissocie pendant la transition entre la phase G2 et la mitose. Les protéines impliquées dans la maturation de l'ARN se trouvent alors au niveau des chromosomes. Les ARNr matures, ainsi que les protéines impliquées dans la maturation, forment des structures nommées corps pré-nucléolaires (PNB pour PreNucleolar Bodies) (Jimenez-Garcia *et al.*, 1994). Savino *et al.* ont montré que ces PNB se forment sur la surface des chromosomes et restent associés avec la chromatine condensée (Savino *et al.*, 2001). Les PNB apparaissent pendant la télophase et disparaissent lorsque le nucléole se reforme en fin de mitose (Dundr *et al.*, 2000). Il a été montré que durant la mitose les facteurs principaux de la transcription, UBF, Pol I et SL1 restent associés aux gènes ribosomiques, c'est-à-dire aux NOR (Roussel *et al.*, 1993 ; Roussel *et al.*, 1996). Cependant, une controverse existe pour Pol I. En effet, une étude plus récente a montré que deux des sous-unités de Pol I, RPA39 et RPA120, se dissocient des gènes ribosomiques pendant la métaphase alors qu'UBF reste associé. Cette dissociation précède la désintégration des composants du nucléole (FC, DFC, GC) (Leung *et al.*, 2004).

Différentes études ont montré que l'inhibition de la transcription des gènes ribosomiques durant la mitose est due à la phosphorylation de certains facteurs de transcription. Kuhn *et al.* montrent que le facteur SL1 est phosphorylé durant la mitose par le complexe cdc2-cycline B (Kuhn *et al.*, 1998). Ce complexe est impliqué dans le passage de la phase G2 à la mitose. Cette phosphorylation inactive SL1 et provoque une inhibition de la transcription Pol I. La phosphorylation de SL1 s'effectue au niveau des sous-unités TBP et TAF_I110 et réduit l'interaction entre SL1 et UBF (Heix *et al.*, 1998). De même que SL1, le facteur TTF-1 reste associé aux gènes ribosomiques et est phosphorylé par le complexe cdc2-cycline B pendant la transition entre la phase G2 et la mitose (Sirri *et al.*, 1999). La phosphorylation de TTF-1 pourrait faire partie du mécanisme de régulation de la transcription

Pol I pendant la mitose. L'inactivation du complexe cdc2-cycline B entraîne la restauration de la transcription Pol I au cours de la mitose (Sirri *et al.*, 2000). De plus, Voit *et al.* ont montré que le facteur UBF est phosphorylé en phase G1 par les complexes cdk4-cycline D et cdk2-cycline E. Le premier complexe permet le passage en phase G1, le deuxième en phase S. Ces données suggèrent un lien entre la progression en phase G1, la phosphorylation de UBF et la reprise de la transcription Pol I (Voit *et al.*, 1999).

ii) Répression des gènes ribosomiques

Environ la moitié des 400 copies d'un gène ribosomique est active alors que l'autre moitié est silencieuse (Conconi *et al.*, 1989). La quantité relative de gènes actifs et de gènes inactifs est similaire dans des cellules en croissance et au repos indiquant que la structure de la chromatine se propage à travers le cycle cellulaire et est indépendante de l'activité transcriptionnelle (Conconi *et al.*, 1989). Les gènes actifs et silencieux se distinguent part leur composition en histone. Les gènes actifs ont une structure euchromatinienne. En effet, les promoteurs des gènes ribosomiques ayant une activité transcriptionnelle ne sont pas méthylés au niveau des îlots CpG et sont associés à des histones acétylées. A l'inverse, les gènes silencieux sont méthylés sur les îlots CpG et déacétylés (Conconi *et al.*, 1989). De plus, les gènes silencieux sont associés à la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et à la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Grummt *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont montré que le facteur NoRC (Complexe de remodelage nucléolaire) joue un rôle dans la répression des gènes ribosomiques (Santoro *et al.*, 2002 ; Strohner *et al.*, 2004). NoRC est un complexe constitué de TIP5 (TTF-1 interacting protein 5) et de SNF2 (Strohner *et al.*, 2001). NoRC est recruté au niveau du promoteur des gènes ribosomiques par l'interaction entre la partie N-terminale de TTF-1 qui est associé au site de terminaison T_0 et la sous-unité TIP5 (Nemeth *et al.*, 2004). TIP5 interagit avec des histones déacétylases (Zhou *et al.*, 2002) et des ADN méthyltransférases (Santoro *et al.*, 2002), ce qui entraîne la déacétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Ces modifications de la chromatine entraînent la méthylation des îlots CpG situés à proximité de l'élément UCE du promoteur. Ceci a pour conséquence d'empêcher la fixation de UBF et la formation du complexe de transcription. La transcription des gènes ribosomiques inactifs est ainsi bloquée.

3) De l'ARN pré-ribosomique aux ribosomes

a) Lieu de synthèse des ARN pré-ribosomiques

Le lieu de la transcription des pré-ARNr a longtemps été controversé (Huang, 2002). En effet, en utilisant une technique similaire (détection de l'UTP marqué), plusieurs équipes ont détecté les ARN transcrits dans le composant fibrillaire dense alors que d'autres ont localisé ces ARN dans le centre fibrillaire des nucléoles. En effet, en 2000, Thiry *et al*. montrent que la transcription a lieu dans le centre fibrillaire (Thiry *et al.*, 2000). Ce résultat est confirmé par Mais *et al*. (Mais *et al.*, 2001). En 2002, Koberna *et al*. montrent que le composant fibrillaire dense est le lieu de synthèse des pré-ARNr. Ils montrent également que la transcription se déroule aussi à la limite entre le composant fibrillaire dense et le centre fibrillaire. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus précédemment par le même groupe (Dundr *et al.*, 1993 ; Stanek *et al.*, 2001) et par d'autres groupes (Cmarko *et al.*, 2000; Hozak *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que la transcription des gènes ribosomiques s'effectue dans les régions fibrillaires. Aujourd'hui, il n'est pas clair si la transcription a lieu dans le centre fibrillaire dense ou dans le centre fibrillaire ou à la limite entre ces deux structures (**figure 7**).

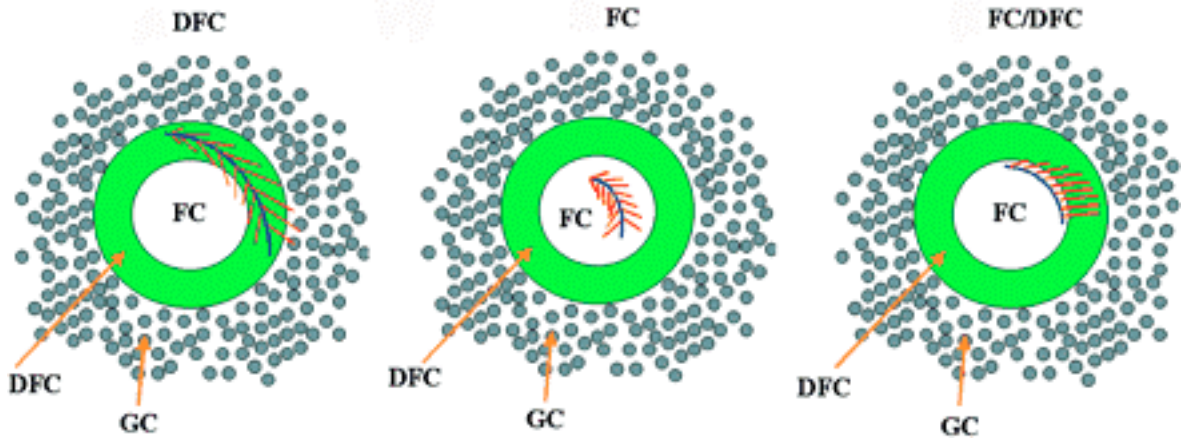

Figure 7 : *Les trois sites possibles de la transcription.*
La synthèse des ARNr a lieu soit dans le composant fibrillaire dense, soit dans le composant fibrillaire, soit à la limite entre ces deux structures. D'après (Conconi et al., 1989).

b) La dynamique des ARN ribosomiques

Des expériences utilisant le bromouridine-triphosphate (Br-UTP) ont été effectuées pour suivre le devenir des particules ribosomiques au sein du nucléole. Le Br-UTP, introduit dans les cellules, est détecté par immuno-marquage et marque l'ARNr nouvellement synthétisé. L'incorporation du Br-UTP s'effectue dans une zone située au centre du nucléole. Des expériences de microscopie électronique identifient cette zone comme étant des composants fibrillaires denses associés aux centres fibrillaires (Cheutin, 2004). Cette localisation du Br-UTP est en accord avec différentes études qui ont montré que la transcription ainsi que les premières étapes de maturation du pré-pré-ARNr, se déroulent dans ces deux structures du nucléole (Huang, 2002). Après 15-30 minutes, l'analyse par microscopie électronique montre que le marquage au Br-UTP se situe au niveau du composant fibrillaire dense et du composant granulaire (Cheutin, 2004). Ce résultat suggère que l'ARNr migre du centre du nucléole vers la périphérie. En effet, après 30-45 minutes, les ARNr s'accumulent à la périphérie du nucléole. La microscopie électronique montre qu'à ce stade seul le composant granulaire est marqué (Cheutin, 2004). Après une heure, les ARNr sont trouvés dans le cytoplasme indiquant que les particules pré-ribosomiques sortent du nucléole (Cheutin, 2004). Plus précisément, il a été montré que les ARNr correspondant à la petite sous-unité du ribosome sont présents dans le cytoplasme 30 minutes après l'incorporation du Br-UTP alors que les ARN de la grande sous-unité sont présents dans le cytoplasme une heure après incorporation (Crocker, 1996).

Pendant la migration des régions fibrillaires vers les composants granulaires, le pré-ARNr subit une maturation qui se traduit par des modifications post-transcriptionnelles et par un certain nombre de clivages engendrés par des protéines non ribosomales.

c) Maturation de l'ARN pré-ribosomique

La maturation du pré-ARNr est un phénomène complexe qui comporte deux étapes : une modification post-transcriptionnelle et un clivage du pré-ARNr à différents sites. Elle nécessite l'intervention de complexes appelés snoRNP (small Nucleolar Ribonucleoprotein) constitués de protéines et de petits ARN nucléolaires, les snoRNA (small nucleolar RNA).

i) Modification de l'ARN pré-ribosomique

Au cours de la transcription ou immédiatement après sa synthèse, le pré-ARNr est modifié au niveau des régions correspondantes aux ARNr 18S, 5.8S et 28S. Il existe deux types de modifications du pré-ARNr, la méthylation et la pseudouridylation. Les snoRNP se divisent en deux familles : la famille boite C/D snoRNP responsable de la méthylation et la famille boite H/ACA snoRNP qui convertit l'uridine en pseudouridine. Il a été montré que ces modifications apparaissent avant le clivage du pré-ARNr en ARNr 18S, 5.8S, 28S (Maden, 1990).

ii) Clivage de l'ARN pré-ribosomique

Par l'intermédiaire de nombreux clivages, les ETS et ITS sont enlevés du pré-ARNr libérant ainsi les ARNr 18S, 5.8S et 28S. Le clivage du pré-ARNr fait intervenir plusieurs complexes snoRNP et est différent selon les espèces. De façon simplifiée, le premier clivage nommé clivage précoce se déroule au niveau de l'extrémité 5' ETS. Il ne mène pas directement aux ARNr matures. La nucléoline intervient dans cette étape dans la mesure ou elle recrute par l'intermédiaire de son domaine N-terminal le complexe U3 snoRNP (Ginisty *et al.*, 1998). La nucléoline est indispensable pour l'interaction entre le complexe U3 et les ETS. Le complexe U3 snoRNA est également impliqué dans la formation de l'ARNr 18S. Ce complexe coupe le pré-ARNr au niveau des ETS et ITS qui entourent l'ARN 18S. Comme U3 snoRNA, U8 snoRNA est impliqué dans le clivage de plusieurs sites situés sur le pré-ARNr (Peculis *et al.*, 1993). En effet, la formation de l'ARNr 5.8S et 28S est supprimée lorsque le complexe U8 snoRNA est inhibé chez le xénope.

d) Assemblage des ribosomes : utilisation des trois machineries de transcription

La formation des ribosomes nécessite la mise en œuvre des trois machineries de transcription (**figure 8**). Le nucléole est le lieu de synthèse des ARNr 5.8S, 18S et 28S par l'ARN Polymérase I. Les protéines ribosomiques sont synthétisées par l'ARN Polymérase II (Pol II). L'ARN ribosomique 5S est transcrit dans le nucléoplasme par l'ARN Polymérase III

(Pol III). Le pré-ARNr s'associe avec environ 80 protéines ribosomiques. Des expériences de microscopie électronique ont révélé que certaines protéines ribosomiques s'associent avec le pré-ARNr au cours de sa synthèse (Chooi *et al.*, 1981). D'autres protéines ribosomiques s'associeront une fois que la maturation des ARNr sera complète. Au final, l'association entre l'ARN 18S et 33 protéines ribosomiques forme la petite sous-unité 40S d'un ribosome. La grande sous unité 60S d'un ribosome se compose des ARNr 5S, 5.8S et 28S auxquels s'associent 49 protéines ribosomiques. La formation des sous-unités s'effectue dans le nucléole. Les sous-unités sont ensuite exportées et associées dans le cytoplasme pour former le ribosome.

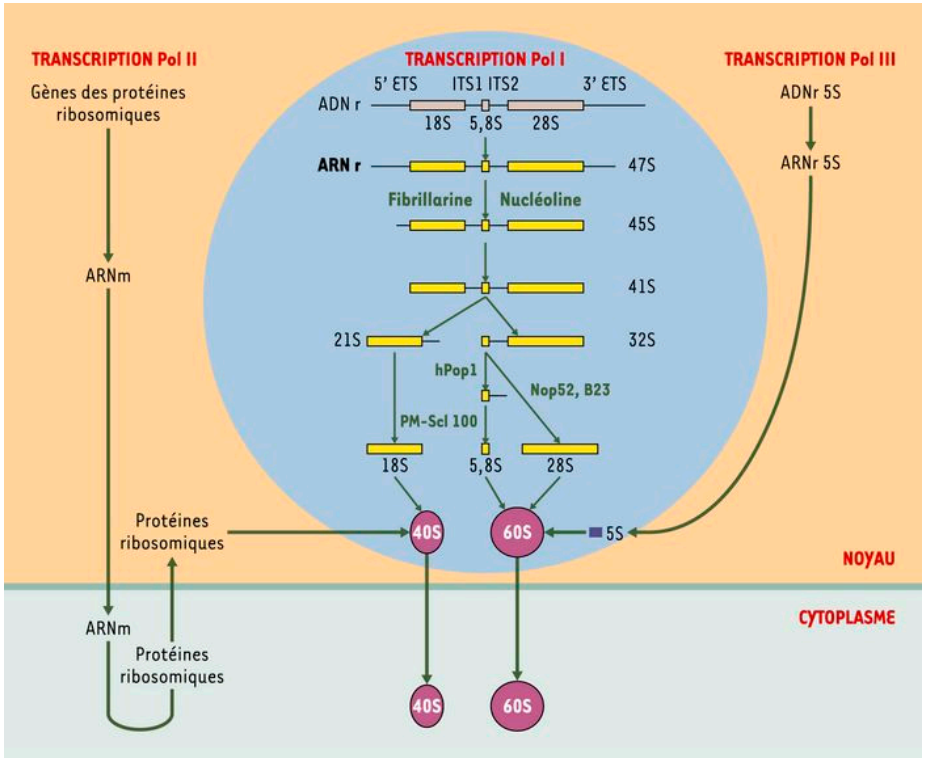

Figure 8 : *Les trois machineries de transcription.*
La synthèse et la maturation des ARNr ont lieu dans le nucléole (cercle bleu). La maturation des ARNr se traduit par l'élimination successive des séquences ETS et ITS. La synthèse des ribosomes nécessite la transcription des ARNr par l'ARN Polymérase I, la transcription de l'ARN 5S par l'ARN Polymérase III et la transcription des gènes codant pour les protéines ribosomiques par l'ARN Polymérase II. Certaines protéines impliquées dans la maturation des ARNr sont indiquées. D'après (Hernandez-Verdun et al., 2004).

Le nucléole est le lieu où débute la synthèse des ribosomes. Un grand nombre de protéines sont nécessaires à son fonctionnement. La nucléoline est une protéine trouvée de façon majoritaire dans le nucléole. Elle peut représenter 10 % des protéines nucléolaires totales (Bugler *et al.*, 1982). C'est une protéine clé dans la transcription et dans les différentes étapes de maturation du pré-ARNr.

II) LA NUCLEOLINE

Ce chapitre décrit la structure de la nucléoline et est suivi d'une présentation du rôle de la nucléoline dans sa fonction principale : la biogenèse des ribosomes. Enfin, nous verrons l'implication de la nucléoline dans d'autres fonctions biologiques.

A) Structure de la nucléoline

La nucléoline fut décrite pour la première fois par Orrick *et al.* en 1973 (Orrick *et al.*, 1973). Cette protéine a été identifiée chez la souris, le hamster, l'homme, le xénope, le poulet, la levure et les plantes (Ginisty *et al.*, 1999). Parmi les différentes espèces étudiées, la structure primaire de la nucléoline est très conservée.

1) Structure primaire

La nucléoline est une protéine de 70 kDa environ. Le domaine N-terminal de la nucléoline est un domaine à la fois acide et basique qui possède de nombreux sites de phosphorylation. Le domaine central a fait l'objet de nombreuses études. Il est divisé en quatre parties nommé domaine de liaison à l'ARN (RNA Binding Domain ou RBD) ou motif de reconnaissance de l'ARN (RNA Recognition Motif ou RRM). Les deux premiers domaines sont impliqués dans l'interaction avec le pré-ARNr (Serin *et al.*, 1997). Les quatre domaines sont requis pour une interaction avec une séquence simple d'ARN notée ECM (Evolutionary Conserve Motif) (Ginisty *et al.*, 2001). Le domaine C-terminal également nommé RGG est un domaine riche en résidus glycine, arginine et phénylalanine. Il est impliqué dans des interactions non spécifiques avec des acides nucléiques qui pourraient faciliter la liaison des RBD avec le pré-ARNr (Ghisolfi *et al.*, 1992). Le domaine C-terminal a également un rôle

dans des interactions protéines-protéines (Bouvet *et al.*, 1998). La nucléoline possède un site de localisation nucléaire (nuclear localization Signal ou NLS) situé entre le domaine N-terminal et le premier RBD (**figure 9**).

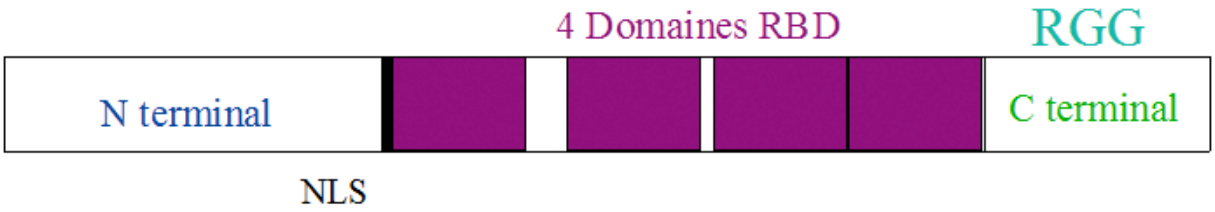

Figure 9 : *Représentation schématique de la nucléoline.*
La nucléoline est divisée en trois domaines. Le domaine N-terminal est hautement acide et basique. Le domaine central est composé de quatre RBD impliqués dans des interactions avec l'ARN. Le domaine C-terminal ou domaine RGG est impliqué dans des interactions avec des acides nucléiques et dans des interactions protéine-protéine. La barre verticale noire représente le site de localisation nucléaire (NLS).

La nucléoline entière n'a pas encore été cristallisée à ce jour. Toutefois, la structure tertiaire des deux premiers RDB a été analysée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

2) Structure tertiaire

Les RBD contiennent entre 80 et 90 acides aminés. Chaque RBD possède deux séquences hautement conservées, les RNP1 et 2 (Birney *et al.*, 1993). La structure tertiaire des RBD 1 et 2 de la nucléoline a été déterminée par RMN de façon individuelle (**figure 10**).

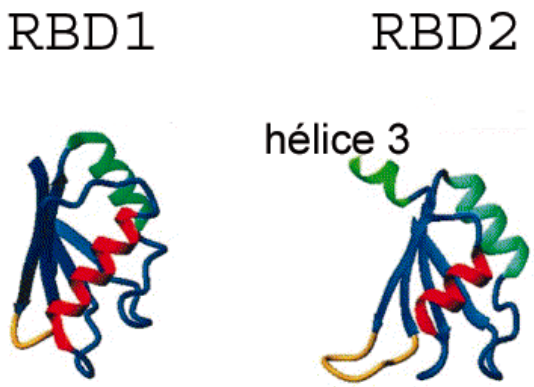

Figure 10 : *modèle en ruban des RBD 1 et 2 de la nucléoline.*
Les hélices α1 et α2 sont en rouge et en vert respectivement. Les feuillets β sont représentés en bleus. La boucle β2-β3 est de couleur jaune. L'hélice 3 du RBD 2 est également représentée. D'après (Allain et al., 2000b).

Chaque RBD possède 4 feuillets β et 2 hélices α associés de la façon suivante : β1α1β2β3α2β4 (Allain *et al.*, 2000b). Même s'ils possèdent la même configuration, les RBD1 et 2 présentent des différences. L'hélice α1 du RBD1 est plus longue que celle du RBD2. La boucle comprise entre les feuillets β2 et β3 est plus courte que celle du RBD2. De plus, le RBD 2 possède une petite hélice au niveau de son extrémité N-terminale. La différence entre ces deux RDB semble importante dans la reconnaissance spécifique de l'ARN cible.

La séquence des RBD 1 et 2 de la nucléoline est conservée d'une espèce à l'autre (**figure 11**).

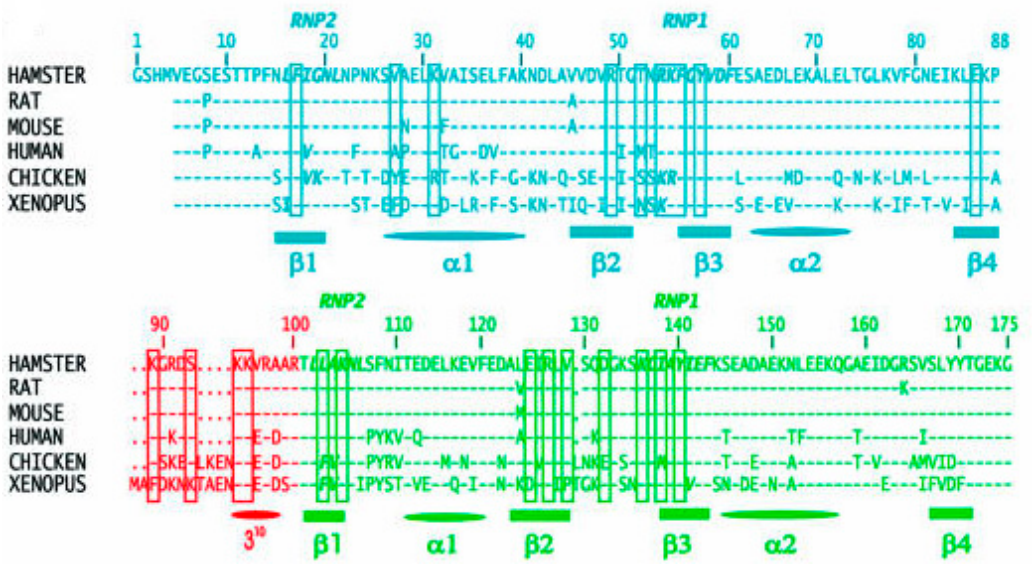

Figure 11 : *Comparaison de séquence des RDB 1 et 2 de différentes espèces.*
Les RBD 1, 2 et la jonction entre les deux sont représentés en bleu, vert et rouge respectivement. La structure secondaire est indiquée au-dessous de la séquence. Les séquences RNP 1 et 2 sont représentées. Les résidus des RBD 1 et 2 de la nucléoline de hamster impliqués dans des interactions ARN-protéines sont encadrés. D'après (Allain et al., 2000a).

Les domaines RBD 1 et 2 sont séparés par une jonction. Des expériences de RMN ont montré l'importance de cette jonction pour l'affinité et la spécificité de l'interaction entre la nucléoline et son ARN cible (Finger *et al.*, 2004).

Par l'intermédiaire des domaines RBD 1 et 2, la nucléoline est capable de se lier au pré-ARNr. C'est l'une des nombreuses fonctions de la nucléoline.

B) Fonction de la nucléoline

1) Localisation de la nucléoline au sein du nucléole

La localisation au sein du nucléole de la nucléoline a fait l'objet de nombreuses études. Cette localisation a été étudiée par microscopie électronique et par immunofluorescence chez les vertébrés (Escande *et al.*, 1985; Spector *et al.*, 1984). Il en résulte que la nucléoline est principalement présente dans le composant fibrillaire dense. Une

petite quantité de nucléoline a également été trouvée dans le composant granulaire. Elle est rarement présente dans le composant fibrillaire (Escande *et al.*, 1985). Au cours de la mitose, le nucléole disparaît et la nucléoline se relocalise. En effet, la nucléoline est présente à la périphérie des chromosomes métaphasiques. En télophase, elle est présente au niveau des PNB (Gas *et al.*, 1985). Durant la mitose, la partie N-terminale de la nucléoline est phosphorylée sur une thréonine par les kinases CDK1 (Peter *et al.*, 1990). Cette phosphorylation est liée à une réorganisation mitotique à travers une condensation de la chromatine nucléolaire.

Le NLS permet à la nucléoline de passer du cytoplasme au noyau (Schmidt-Zachmann *et al.*, 1993). De plus, la localisation de la nucléoline dépend de son état de phosphorylation. En effet, la présence de la nucléoline dans le cytoplasme est liée à la phosphorylation de celle-ci par les kinases cdc2 alors que le passage dans le noyau est accompagné par une déphosphorylation (Schwab *et al.*, 1997). Sa localisation dans le nucléole nécessite la présence des RBD et du domaine RGG. Cependant, ces domaines ne sont pas suffisants pour permettre une localisation dans le nucléole de protéines non nucléolaire (Schmidt-Zachmann *et al.*, 1993). Il a donc été proposé que l'accumulation de la nucléoline dans le nucléole serait due à l'affinité de celle-ci pour les composants du nucléole comme le pré ARNr (Schmidt-Zachmann *et al.*, 1993).

2) Rôle de la nucléoline dans la synthèse des ribosomes

Nous avons vu précédemment, qu'une fois transcrit, le pré-ARNr subit une maturation par clivages, ce qui aboutit à la formation des ARNr puis des ribosomes. La nucléoline intervient à différents niveaux de la maturation du pré-ARNr et de l'assemblage des ribosomes.

a) Rôle dans la transcription Pol I

Il a été montré que la nucléoline se lie à la chromatine (Olson *et al.*, 1983b). Elle se lie préférentiellement à une séquence d'ADN située dans l'espacer non transcrit de l'ADNr localisé en amont du site d'initiation de la transcription (Olson *et al.*, 1983a). De plus, la nucléoline est capable d'interagir avec l'histone H1 par l'intermédiaire de son domaine N-terminal phosphorylé provoquant ainsi la décondensation de la chromatine (Erard *et al.*, 1988). Toutes ces données suggèrent que la nucléoline peut avoir un rôle dans la régulation de

la transcription des ARNr. Différentes expériences ont montré la relation entre la nucléoline et la transcription Pol I. Dans un système de transcription *in vitro*, l'inhibition de la dégradation de la nucléoline (par protéolyse) entraîne une inhibition de la transcription (Bouche *et al.*, 1984). Egyhazi *et al.* montrent que l'injection d'anticorps dirigés contre la nucléoline dans des cellules de glandes salivaires de *Chironomus tentas* stimule la synthèse du pré-ARNr (Egyhazi *et al.*, 1988). Dans cette expérience, l'inhibition de la nucléoline par les anticorps n'est pas clairement démontrée. En 2002, Roger *et al.* montrent que l'injection de nucléoline dans des oocytes de xénope entraîne une baisse de l'accumulation du pré-ARNr alors que la transcription Pol II et Pol III n'est pas affectée. La nucléoline entraîne une inhibition de la transcription et ceci de façon indépendante de la séquence d'ARN transcrite. Les auteurs proposent que la nucléoline affecte la transcription Pol I en agissant soit sur le complexe de transcription, soit sur le promoteur de l'ADNr et non pas par l'intermédiaire de son interaction avec le pré-ARNr (Roger *et al.*, 2002). Une étude récente a montré que l'inhibition de l'expression de la nucléoline par ARN interférant bloque la synthèse du pré-ARNr (Rickards *et al.*, 2006). De plus, la nucléoline s'associe aux gènes ribosomiques alors qu'elle ne s'associe pas avec des gènes transcrits par Pol II et Pol III. Ces données renforcent l'hypothèse que la nucléoline est nécessaire pour la transcription des gènes ribosomiques.

b) Rôle de chaperonne d'ARN de la nucléoline

La nucléoline a la capacité d'interagir avec le pré-ARNr dès que celui-ci est transcrit (Ghisolfi-Nieto *et al.*, 1996). Cette interaction est possible grâce à la présence de site de liaison de la nucléoline.

i) Elément de reconnaissance de la nucléoline

La nucléoline interagit de façon spécifique et transitoire avec une séquence appelée élément de reconnaissance de la nucléoline (Nucleolin Recognition Element ou NRE) (Ghisolfi-Nieto *et al.*, 1996) (**figure 12**). Cette séquence est trouvée tout le long du pré-ARNr et est localisée dans les ETS et les ITS (Serin *et al.*, 1996). 11 sites NRE sont présents dans la partie 5' ETS du pré-ARNr humain. 3, 2, 4, 9 et 3 sites NRE sont respectivement présents dans le 18S, ITS1, ITS2, 28S et la partie 3'. Chez l'homme, cela fait donc 32 NRE alors que chez la souris, il y en a 39 (Serin *et al.*, 1996). Cette séquence se présente sous la forme d'une structure tige-boucle dont la boucle se compose de 6 nucléotides correspondant au motif

UCCCGA (**figure 12**B). La nucléoline reconnaît cette séquence spécifiquement puisqu'une seule mutation de la séquence entraîne une inhibition de l'interaction entre la nucléoline et son ARN cible. Il a été montré que les deux premiers domaines de liaison à l'ARN (RBD 1 et 2) sont nécessaires et suffisants dans la reconnaissance du NRE (Serin *et al.*, 1997) (**figure 12**A).

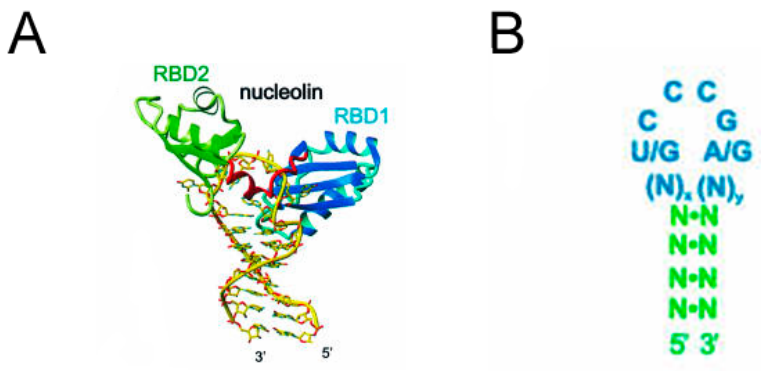

Figure 12 : *Structure du complexe RBD 1,2-NRE par RMN.*
(A), structure du complexe par RMN. L'interaction s'effectue au niveau d'une tige boucle contenue dans l'ARN cible. Les RBD 1 et 2 interagissent de façon opposée avec cette boucle. (B), représentation schématique de la séquence consensus NRE et de la structure secondaire. D'après (Allain et al., 2000a).

Les RBD 1 et 2 interagissent de façon opposée avec l'ARN (Allain *et al.*, 2000a). En effet, le RBD1 se lie au niveau de la partie 3' de la boucle ainsi qu'avec le haut de la tige. Le RBD2 se lie au niveau de la partie 5' de la boucle.

Le fait que la nucléoline interagisse de façon transitoire avec l'ARN en cours de synthèse sur différents sites NRE placés tout au long de l'ARN, suggère que cette protéine puisse avoir un rôle de chaperonne d'ARN.

ii) Repliement « exact » de l'ARN pré-ribosomique

Les chaperonnes d'ARN sont des protéines intervenant dans le repliement des ARN. En effet, les ARN peuvent se replier dans des conformations alternatives ou inactives. Certaines protéines de liaison à l'ARN résolvent ce problème en agissant comme des chaperonnes. Elles préviennent ou résolvent la formation de structures alternatives stables mais incorrectes assurant ainsi la disponibilité des ARN pour leur fonction biologique (Herschlag, 1995). Cette activité de chaperonne a été montrée pour le complexe hnRNPA1

qui se lie à l'ARN cible nouvellement synthétisé et facilite le désassemblage de duplex à l'intérieur de l'ARN simple brin (Lorsch, 2002). Il a été montré également qu'un ensemble de protéines formant un complexe impliqué dans l'assemblage des ribosomes chez *Schizosaccharomyces pombe* interagissent avec des sites de liaison spécifique à l'intérieur des ETS et ITS et organisent l'ARN pour permettre un clivage précis et efficace par d'autres protéines (Lalev *et al.*, 2001).

Il a été montré que la nucléoline induit et/ou stabilise la structure en tige boucle de l'ARN (Allain *et al.*, 2000a). Les bases de la séquence consensus ne sont alors plus disponibles pour un autre appariement. La liaison de la nucléoline empêcherait ainsi la formation de repliements alternatifs stables de l'ARN avant la fin de la transcription. Par la suite, ces sites de liaison de la nucléoline seront impliqués dans la formation de très longues hélices riches en GC dans le pré-ARNr mature et la petite structure secondaire en tige-boucle sera relâchée. La nucléoline jouerait donc un rôle transitoire permettant le repliement « exact » du pré-ARNr (**figure 13**).

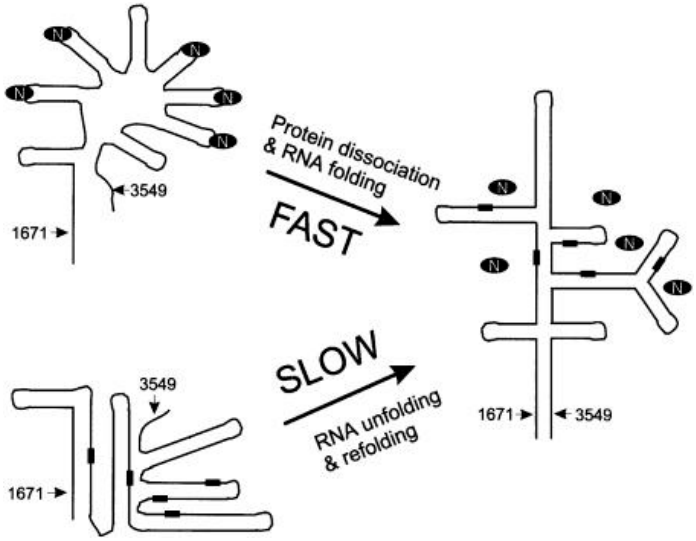

Figure 13 : *Modèle représentant l'activité de chaperonne de la nucléoline.*
Seule la partie du pré-ARNr comprise entre les nucléotides 1671 et 3549 est représentée. Les NRE sont représentés par des rectangles noirs, la nucléoline par des cercles noirs. A droite de la figure est représenté de façon schématique le pré-ARNr correctement replié. A gauche de la figure sont représentés deux structures alternatives stables avec ou sans nucléoline. Sans nucléoline, l'ARN est piégé dans une structure qui est incorrecte. Cet ARN doit donc se replier correctement. Ce processus est lent. En présence de nucléoline, l'ARN adopte une structure correcte. D'après (Allain et al., 2000a).

La nucléoline n'est pas seulement impliquée dans le repliement « exact » du pré-ARNr. Elle intervient également dans le processus de clivage et d'assemblage des particules ribosomiques.

c) Clivage précoce et assemblage des ribosomes

Il a été proposé que la nucléoline entraîne la formation de structures secondaires au niveau du pré-ARNr et ceci dans les premières étapes de sa synthèse (Sipos *et al.*, 1991). La nucléoline intervient dans le clivage précoce du pré-ARNr (Ginisty *et al.*, 1998). Le clivage est réalisé lorsque le pré-ARNr est en cours de synthèse ou juste après sa synthèse (Lazdins *et al.*, 1997). Il a été suggéré que la nucléoline interagit en premier avec le pré-ARNr et participe à l'établissement d'un complexe de maturation puisqu'elle recrute par l'intermédiaire de son domaine N-terminal le complexe snoRNP U3 responsable du clivage au sein du pré-ARNr (Ginisty *et al.*, 1998).

Il a été montré que la nucléoline se déplace entre le noyau et le cytoplasme. De ce fait, il a été suggéré que la nucléoline puisse avoir un rôle dans le transport des particules ribosomiques du cytoplasme vers le noyau et enfin vers le nucléole. Par la suite, il a été démontré que la nucléoline, par l'intermédiaire de son domaine RGG, interagit avec des protéines ribosomiques (Bouvet *et al.*, 1998). Ce dernier résultat renforce donc l'hypothèse du transport des particules ribosomiques par la nucléoline. L'interaction de la nucléoline avec les ARNr (Ghisolfi-Nieto *et al.*, 1996) et avec les protéines ribosomiques suggèrent un rôle de la nucléoline dans les premières étapes de l'assemblage des ribosomes.

3) Les autres fonctions de la nucléoline

La nucléoline est une protéine multifonctionnelle dans la mesure où son rôle n'est pas seulement limité à la synthèse des ribosomes. Elle intervient également dans d'autres fonctions biologiques.

a) Rôle dans la transcription Pol II

Différentes expériences ont montré que la nucléoline est impliquée dans la répression de la transcription Pol II. En effet, Yang *et al*. montrent que la nucléoline est un répresseur de la transcription de la glycoprotéine Alpha 1 acide (Yang *et al.*, 1994). Cette protéine

s'exprime lors de la réponse immunitaire à une inflammation. Gabellini *et al.* montrent qu'un complexe contenant de multiples protéines notamment la nucléoline se lie à des séquences répétées nommées D4Z4 situées dans le chromosome 4. Cette liaison provoque une inhibition de la transcription des gènes situés sur ce chromosome (Gabellini *et al.*, 2002). La nucléoline a été décrite comme interagissant ou faisant partie de complexe de transcription comme le complexe LR1 qui régule la transcription dans les cellules B activées (Hanakahi *et al.*, 1997). Ying *et al.* montrent que la nucléoline interagit avec les facteurs de transcription A-myb et c-myb et affecte leur activité transcriptionnelle (Ying *et al.*, 2000).

b) La nucléoline et la réponse à un stress

La protéine p53 est le premier médiateur de la réponse à un stress. Dans des conditions normales, la protéine HDM2 ubiquitinise p53, ce qui provoque la dégradation de p53 par le protéasome (Latonen *et al.*, 2005). Au cours d'un stress, la nucléoline est capable d'interagir avec HDM2, de réduire la quantité de cette protéine et d'entraîner une accumulation de p53 (Saxena *et al.*, 2006). Il a été montré également que la nucléoline interagit avec la protéine de réplication A (Replication Protein A ou RPA) au cours d'un choc thermique. La protéine RPA a un rôle dans l'initiation et dans l'élongation de la réplication mais aussi dans la réparation et la recombinaison de l'ADN. Lors d'un choc thermique, la nucléoline se déplace du nucléole vers le nucléoplasme pour interagir avec RPA bloquant ainsi la réplication de l'ADN (Wang *et al.*, 2001). Tous ces résultats suggèrent un rôle important de la nucléoline dans la réponse à un stress cellulaire.

c) La réparation, la recombinaison et la réplication

Il a été suggéré que la nucléoline ait un rôle dans la réparation, la recombinaison et la réplication de l'ADN. Elle est capable d'interagir avec des protéines impliquées dans ces trois fonctions biologiques. En effet, la nucléoline accélère le rappariement de séquences complémentaires contenant un nombre limité d'erreurs. L'activité d'appariement de la nucléoline se situe dans les RBD 3 et 4 ainsi que dans le domaine RGG. De plus, la nucléoline interagit avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme la protéine YB-1 (Gaudreault *et al.*, 2004). Le domaine N-terminal de la nucléoline est nécessaire et suffisant pour interagir avec la topoisomérase I. Cette interaction est impliquée dans la localisation cellulaire de la topoisomérase I (Edwards *et al.*, 2000). Il a récemment été montré que la

nucléoline interagit avec la protéine Rad51, protéine impliquée dans la recombinaison (De *et al.*, 2006). Seinsoth *et al.* suggèrent que la nucléoline est capable de former un complexe contenant une hélicase au niveau des fourches de réplication (Seinsoth *et al.*, 2003).

d) La nucléoline est une chaperonne d'histone

La présence de la région acide située dans le domaine N-terminal de la nucléoline est une caractéristique de beaucoup de protéines présentant une activité chaperonne d'histones (Philpott *et al.*, 2000). Ce domaine N-terminal est requis pour l'activité de chaperonne de la nucléoline mais il n'est pas suffisant puisqu'une nucléoline tronquée ne contenant que ce domaine ne possède pas d'activité de chaperonne d'histones (Angelov *et al.*, 2006). Il a été montré que la nucléoline possède une activité de type FACT (Facilitates Chromatin Transcription), c'est-à-dire qu'elle est capable d'assister la formation/déformation d'un nucléosome afin de rendre possible la transcription de la chromatine (Angelov *et al.*, 2006). De plus, la présence de nucléoline permet au facteur SWI/SNF de remodeler le nucléosome contenant macroH2A. Nous avons vu que la nucléoline peut interagir avec la chromatine et qu'elle a un rôle important dans la transcription Pol I. Toutes ces données suggèrent un rôle de la nucléoline au niveau de la chromatine.

III) LA CHROMATINE

Cette partie présente en premier lieu la structure de la chromatine. Je vais décrire le nucléosome, composé d'histones, ainsi que la compaction et l'organisation de la chromatine. Nous verrons également la relation entre la structure et la fonction de la chromatine.

A) Composition et structure de la chromatine

La chromatine est une structure complexe dont les caractéristiques structurales sont encore mal connues. Le terme de chromatine fut employé pour la première fois en 1882 par Walther Flemming. C'est une structure présente à l'intérieur du noyau des cellules. Il est connu de puis longtemps que la chromatine est constituée d'ADN et de protéines. L'ADN est

chargé négativement du fait de la présence de groupements phosphate. Ces charges négatives permettent à l'ADN d'interagir avec des protéines basiques appelées histones. L'ensemble ADN + histones forme l'unité de base de la chromatine, le nucléosome.

1) Le nucléosome

Le nucléosome à la forme générale d'un cylindre de 11 nm de diamètre et de 6 nm de long. La structure cristallographique du nucléosome réalisée en 1997 par Luger *et al.* montre que la particule de cœur du nucléosome est formée de 146 paires de base (pb) d'ADN qui font 1,65 tour autour d'un octamère d'histones (Luger *et al.*, 1997 ; Rhodes, 1997) (**figure 14**). L'octamère canonique d'histone comprend 4 histones (H2A, H2B, H3, H4) présentent sous la forme d'un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ et de deux dimères (H2A-H2B).

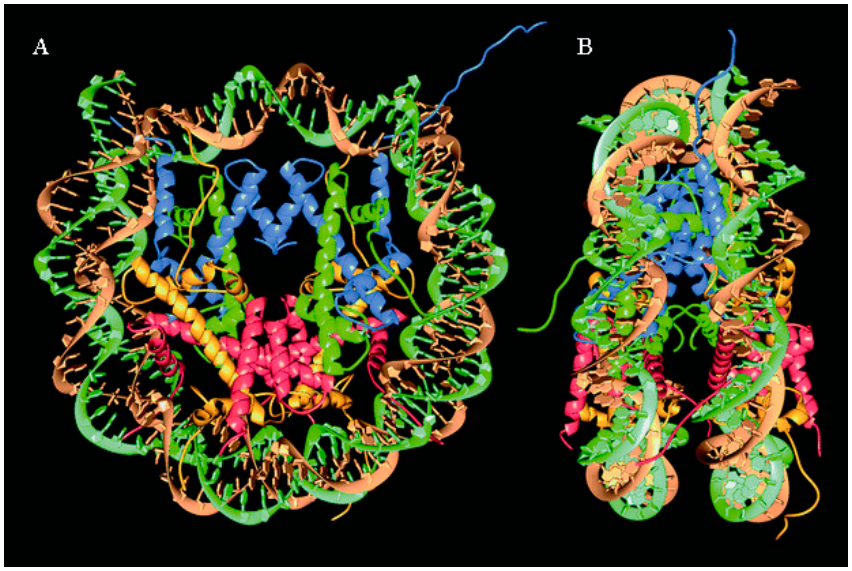

Figure 14 : *Structure cristallographique de la particule de cœur d'un nucléosome à 2,8 Å. (A), le nucléosome est vu de face. Les histones H2A (jaune), H2B (rouge), H3 (bleu) et H4 (vert) sont entourées d'une hélice d'ADN (brins en vert et bronze). (B), le nucléosome est vu de profil. D'après (Luger et al., 1997).*

Les histones qui composent un nucléosome sont des protéines dont la masse moyenne est de 13 kiloDaltons (kDa) soit environ 120 acides aminés. Ces histones sont appelées histones conventionnelles ou canoniques.

a) Les histones conventionnelles

Il existe 5 types d'histones conventionnelles :

• H2A, H2B, H3 et H4 nommées histones de cœur.

• H1 nommée histone de liaison.

Leur synthèse est couplée à la réplication de l'ADN. L'ADN ainsi que les histones nouvellement synthétisées s'associeront pour former de la chromatine. Les histones sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution. Elles sont constituées de deux domaines : un domaine globulaire en C-terminal et un domaine N-terminal prolongeant le domaine globulaire par une queue. Le domaine N-terminal est ainsi appelé « histone tail ». Il est dépourvu de structure secondaire. Ce domaine présente un taux élevé d'arginine et de lysine. Ces deux acides aminés sont chargés positivement sur les amines de leur chaîne latérale. Le domaine N-terminal est une partie variable. En revanche, le domaine globulaire est la partie la plus conservée des histones. Ce domaine est composé d'un motif « histone fold » qui comprend trois hélices α (α1, α2 et α3) séparées par deux boucles (L1 et L2). Pour chaque histone, les hélices et les boucles sont associées de la façon suivante : α1-L1-α2-L2-α3. Ce domaine est impliqué dans l'assemblage des histones en un nucléosome.

b) Les variants d'histone

Les variants des histones conventionnelles sont des isoformes non alléliques des histones conventionnelles. Les variants possèdent également une structure comprenant trois hélices α et deux boucles. Les histones conventionnelles H2A, H2B et H3 possèdent toutes au moins un variant alors qu'aucun variant n'est encore connu pour H4. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux variants de H2A. En effet, il a été montré que l'un de ses variants est présent dans le nucléole. Il existe au moins 4 variants de H2A : H2A.X, H2A.Z, macroH2A et H2A-Bbd.

i) H2A.X et H2A.Z

Historiquement, les deux premiers variants de H2A identifiés sont H2A.X (Mannironi *et al.*, 1989) et H2A.Z (Suto *et al.*, 2000). H2A.X présente 95 % d'homologie avec H2A. Chez les mammifères, 2 à 25 % des nucléosomes contiennent ce variant.

H2A.Z est nommé différemment selon les espèces (HTA3 chez *S. cereviae*, PHT1 chez *S. pombe,* H2AvD chez la drosophile). Chez les mammifères, son expression est indépendante de la synthèse d'ADN (Hatch *et al.*, 1990). Ce variant possède 63 % d'homologie avec l'histone conventionnelle H2A et 90 % entre les espèces. Il représente 10 % des histones de type H2A. Malgré ce faible pourcentage, H2A.Z est distribué sur l'ensemble de la chromatine. L'analyse cristallographique d'un nucléosome contenant H2A.Z montre que sa structure est similaire à celle d'un nucléosome contenant H2A (Suto *et al.*, 2000). Toutefois, ce variant possède des acides aminés spécifiques par rapport à l'histone H2A. Ces acides aminés seraient responsables de la déstabilisation de l'association entre le dimère (H2A.Z-H2B) et le tétramère (H3-H4).

ii) MacroH2A

MacroH2A a été découvert en 1992. Il doit son nom à sa taille inhabituellement grande pour une histone (372 acides aminés soit 40 kDa environ), qui représente près de trois fois la taille de l'histone H2A conventionnelle (Pehrson *et al.*, 1992). Le premier tiers de la protéine nommé H2A-like possède environ 64 % d'homologie de séquence avec H2A. Le reste ne contient aucun motif de type histone fold. Cette région est appelée NHR (Non Histone Region) (Chadwick *et al.*, 2001a). Deux sous-types de macroH2A ont été identifiées : macroH2A1 (Pehrson *et al.*, 1997) et macroH2A2 (Costanzi *et al.*, 2001). Ces deux protéines présentent entre elles 84 % d'homologie de la séquence « histone fold » et 68 % de la partie NHR. Le gène de macroH2A1 code pour deux isoformes, macroH2A1.1 et macroH2A1.2, issues d'un épissage alternatif (Pehrson *et al.*, 1997).

Des études détaillées de protéomique ont récemment montré que macroH2A est pour l'instant le seul variant d'histone présent dans le nucléole (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002). De nombreuses études suggèrent que macroH2A est enrichi dans différentes régions du noyau incluant le chromosome X inactif (Chadwick *et al.*, 2001c; Costanzi *et al.*, 2000 ; Perche *et al.*, 2000) (**figure 15**). Il est aussi présent dans les autosomes ainsi que dans le chromosome X actif mais en quantité moins importante que dans le chromosome X inactif (Abbott *et al.*, 2005 ; Chadwick *et al.*, 2001c). Chadwick *et al.* montrent également que macroH2A est associé à la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans des cellules en métaphase (Chadwick *et al.*, 2002).

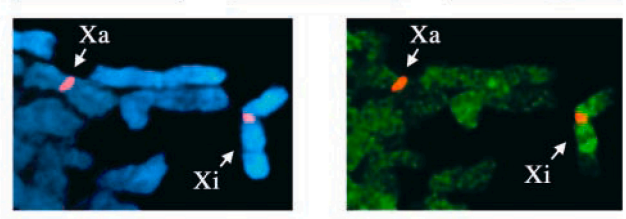

Figure 15 : *Localisation par microscopie de fluorescence de macroH2A au sein de cellule en métaphase.*
A gauche, les chromosomes sont colorés au DAPI (bleu). A droite, visualisation de macroH2A par un anticorps (vert). MacroH2A est enrichie dans le chromosome X inactif (Xi). Les chromosomes Xi et chromosome X actif (Xa) sont repérés par hybridation in situ (rouge). D'après (Chadwick et al., 2002).

MacroH2A est également observé dans une zone d'hétérochromatine nommée SAHF (Senescence Associated Heterochromatin Foci) (Zhang *et al.*, 2005b). SAHF est induit lorsque les cellules sont en sénescence (vieillissement). Cela correspond à une zone non transcrite de la chromatine.

iii) H2A-Bbd

C'est en 2001 que H2A-Bbd a été identifié. Ce variant possède 48 % d'homologie avec l'histone H2A conventionnelle. Dans sa partie N-terminale, six arginines sont contiguës et un acide aminé, la lysine, y est totalement absent. La différence majeure de séquence entre ce variant et l'histone conventionnelle se situe dans le domaine "docking" qui intervient dans l'interaction entre H2A et le tétramère $(H3\text{-}H4)_2$. En effet, la partie C-terminale et la fin du domaine « docking » que l'on retrouve dans H2A ne sont pas présentes dans H2A-Bbd. Ce variant ne possède qu'une seule lysine contre 14 pour H2A. H2A-Bbd est donc moins basique et pourrait être régulé d'une manière différente de H2A. Il est totalement absent du chromosome X inactif (corps de Barr) ce qui lui valu son nom de H2A-Bbd pour Barr Body Deficient (**figure 16**). Il a été montré que H2A-Bbd colocalise avec l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 (Chadwick *et al.*, 2001b).

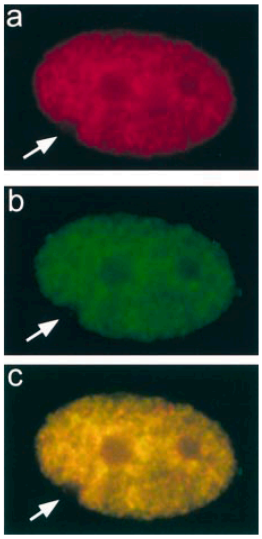

Figure 16 : *Localisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd au sein du noyau de cellule interphasique.*
(a), visualisation de H2A-Bbd fusionné à un tag myc. L'anticorps utilisé pour l'observation est dirigé contre le tag. La flèche montre la localisation du chromosome X inactif. H2A-Bbd semble présent dans tout le noyau à l'exception de ce chromosome. (b), visualisation de l'acétylation de la lysine 12 de H4 à l'aide d'un anticorps. (c), superposition de H2A-Bbd et de l'acétylation. D'après (Chadwick et al., 2001b).

Les histones conventionnelles ainsi que les variants s'unissent les uns avec les autres pour former avec l'ADN le nucléosome. Le nucléosome est le premier niveau de compaction de la chromatine. En effet, pour pouvoir être contenue dans un noyau de quelques µm de diamètre, la chromatine doit être compactée. Cette compaction dépend de l'état physiologique de la cellule. Au cours de la vie cellulaire, la chromatine adopte différents niveaux de compaction. Lorsque la cellule est en interphase (réplication de l'ADN), la chromatine est relâchée. Lorsque la cellule est prête à se diviser (mitose) la chromatine est fortement condensée en chromosomes.

2) Organisation de la chromatine

a) Les niveaux de compaction de la chromatine

La compaction de la chromatine comprend plusieurs étapes qui commence par la formation du nucléosome et qui finit par une structure très compacte, le chromosome métaphasique. La structure la plus simple est le nucléofilament (**figure 17**) (Thoma *et al.*,

1979). Le diamètre de cette structure est d'environ 11 nm, ce qui correspond au diamètre d'un nucléosome. Il faut noter que le nucléosome représente l'ensemble particule cœur (octamère + 146 paires de base) et l'ADN de liaison entre deux nucléosomes successifs.

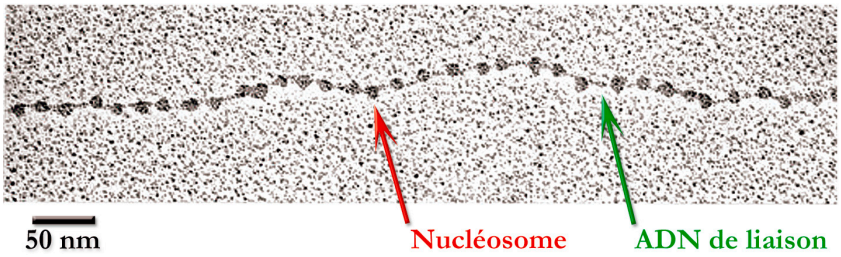

Figure 17 *: Cliché de microscopie électronique du nucléofilament.*
Les boules noires représentent des nucléosomes le long d'une double hélice d'ADN. Les nucléosomes sont séparés par de l'ADN de liaison (région internucléosomale). D'après Victoria Foe.

La fibre de 30 nm est la structure observée lorsque le nucléofilament et les histones de liaison (histone H1) sont mélangées dans des conditions ioniques physiologiques (Bednar *et al.*, 1998). Les extrémités N et C-terminales de l'histone H1 interagiraient avec l'octamère et l'ADN de liaison (Hamiche *et al.*, 1996). H1 interagit avec l'ADN de liaison au niveau de la zone où l'ADN entre et sort du nucléosome. Il existe deux modèles d'organisation de la fibre de 30 nm. Le premier modèle est la « fibre solénoïde ». Dans ce modèle, l'histone H1 courberait l'ADN de liaison et permettrait un agencement hélicoïdal du nucléofilament. Le pas de l'hélice serait de 6 nucléosomes. Le second modèle est le modèle zigzag. Dans ce modèle, l'ADN de liaison est rigide et le nucléofilament suit une trajectoire zigzagante (Bednar *et al.*, 1998; van Holde *et al.*, 1995). Le repliement de la fibre de 30 nm sur elle-même entraîne la formation de boucle. Le diamètre de ces boucles est de 300 nm. L'arrangement de ces boucles entre elles constitue le chromosome métaphasique (**figure 18**).

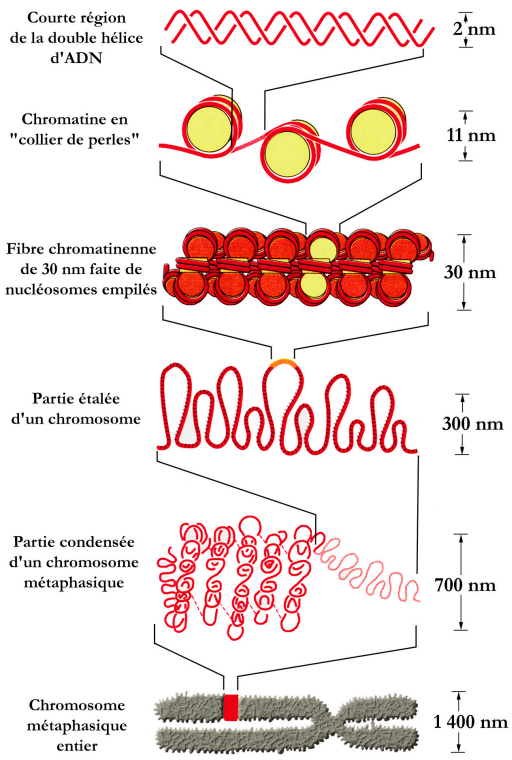

Figure 18 : *Les niveaux de compaction de la chromatine.*
L'ADN s'enroule autour des nucléosomes pour former une fibre de 11 nm. En présence de l'histone de liaison H1, cette fibre s'enroule sur elle-même pour former une fibre de 30 nm. Cette fibre de 30 nm est présente dans des boucles d'environ 300 nm qui sous forme plus ou moins condensée constituent le chromosome. Adapté de (Alberts et al., 1998).

Le degré de compaction de la chromatine ne diffère pas uniquement suivant l'état physiologique de la cellule. Il diffère également en fonction de la zone du noyau où se situe la chromatine. La chromatine existe sous deux formes : l'hétérochromatine et l'euchromatine.

b) Hétérochromatine et euchromatine

En 1928, Emil Heitz définit l'hétérochromatine comme les segments de chromatine apparaissant très condensés, souvent en agrégats, et très denses dans le noyau interphasique. Elle est située généralement contre l'enveloppe nucléaire et en amas isolés au centre du noyau. Elle inclut notamment les centromères et les télomères. Il existe deux types d'hétérochromatine, l'hétérochromatine constitutive et facultative. Ces deux formes présentent quelques différences essentiellement liées à l'ADN qu'elles contiennent. La forme constitutive

semble rester condensée en permanence. Elle est constituée d'un ADN appelé ADN satellite composé de séquences courtes répétées en tandem un certain nombre de fois. L'hétérochromatine facultative n'est pas particulièrement riche en ADN satellite. Une autre différence entre ces deux formes concerne leur stabilité. L'hétérochromatine constitutive est plus stable que la facultative. En effet, cette dernière est réversible, c'est-à-dire qu'elle est capable de passer d'un état condensé à un état moins condensé suivant le stade de développement ou le type cellulaire étudié. Contrairement à l'hétérochromatine, l'euchromatine est une forme moins condensée de la chromatine. Cette forme est localisée au centre du noyau. Au microscope, elle apparaît plus claire et plus diffuse (**figure 19**).

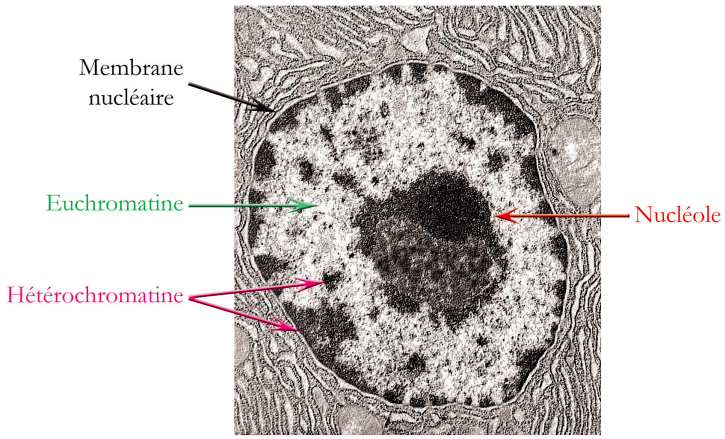

Figure 19 : *Noyau d'une cellule eucaryote en interphase vu par microscopie électronique. Le noyau est entouré d'une membrane nucléaire. La chromatine est soit sous forme d'hétérochromatine (zone compacte) soit sous forme d'euchromatine (zone peu compacte). L'hétérochromatine est principalement localisée à la périphérie du noyau alors que l'euchromatine est préférentiellement localisée au centre. Le nucléole apparaît comme une zone dense au centre du noyau.*
(http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg)

En plus de cette compaction, la chromatine est organisée dans l'espace. L'emplacement de la chromatine dans le noyau ne se fait pas au hasard. La chromatine interphasique se répartit en certaines zones précises du noyau.

c) Les territoires chromosomiques

Un territoire chromosomique est une zone de l'espace occupée majoritairement par un chromosome. Il a été montré que le positionnement des territoires chromosomiques est

corrélé à la taille du chromosome (Cremer *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2000). En effet, Sun *et al.* ont montré que les petits chromosomes sont situés au centre du noyau alors que les grands chromosomes sont positionnés en périphérie. Le positionnement de ces territoires dépend également de la quantité de gènes présents (Cremer *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999). Par exemple, les chromosomes humains 18 et 19 ont une taille très proche. Cependant, il a été montré que le chromosome humain 18 qui contient une chromatine pauvre en gène est situé à la périphérie des noyaux de lymphocytes en prolifération (Croft *et al.*, 1999 ; Tanabe *et al.*, 2002). En revanche, le chromosome 19, plus riche en gènes, est situé près du centre du noyau. La même observation a été effectuée sur des noyaux de fibroblaste de poulet (Habermann *et al.*, 2001). Les chromosomes qui contiennent le plus de gènes actifs sont au centre du noyau alors que les chromosomes qui en possèdent le moins sont à la périphérie (**figure 20**). En ce qui concerne les chromosomes X actifs et inactifs, Eils *et al.* montrent que le volume du territoire chromosomique de chaque chromosome est similaire. En revanche, la forme et la surface de ces territoires sont différentes (Eils *et al.*, 1996).

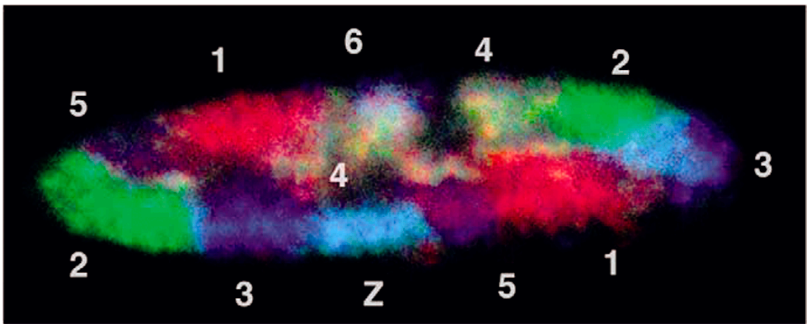

Figure 20 : *Organisation de la chromatine en territoires chromosomiques d'un fibroblaste de poulet.*
Les chromosomes ont été marqués par hybridation in situ (FISH). Les numéros et la lettre définissent un chromosome. D'après (Habermann et al., 2001).

La structure de la chromatine nous indique que les régions de la chromatine situées au centre du noyau sont riches en gènes et sont moins compactées. En revanche, les régions situées à la périphérie sont appauvries en gènes actifs et fortement compactées. La composition en histone du nucléosome varie également, ce qui entraîne dans certains cas un changement de structure de la chromatine. Chaque histone (conventionnelle et variant) semble avoir un rôle précis. Depuis de nombreuses années, l'étude de la relation entre la structure et la fonction de la chromatine est au centre de très nombreux travaux.

B) Les fonctions de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique. Son rôle n'est pas seulement de compacter une grande quantité d'ADN dans le petit espace que représente le noyau. Elle participe activement à la régulation de toutes les activités qui nécessite un accès à l'ADN : la transcription, la réplication, la réparation et la recombinaison. Cette régulation s'effectue par la compaction de la chromatine mais aussi par l'intermédiaire des modifications d'histones et des variants d'histone.

1) Régulation par la compaction de la chromatine

Les nucléosomes contenus dans la chromatine représentent un premier obstacle pour l'accès à l'ADN. En effet, il a été montré qu'un nucléosome immobile empêche la transcription (Gottesfeld *et al.*, 2002). De façon plus précise, Georges *et al.* montrent que le nucléosome empêche l'ARN Polymérase II d'accéder à l'ADN pour la transcription (Georges *et al.*, 2002). La compaction de l'ADN est donc associée à une inhibition de la transcription. La division de la chromatine en hétérochromatine et en euchromatine indique que l'organisation de la chromatine pourrait influencer la fonction des gènes. En effet, la région d'hétérochromatine fortement condensée est associée à une inactivation de la transcription (Dillon, 2004). A l'intérieur de l'hétérochromatine, l'ADN est inaccessible aux nucléases. Elle est constituée d'ilôts CpG méthylés qui sont associés à une inhibition de la transcription (Bird *et al.*, 1999). L'euchromatine, région décondensée, est accessible aux nucléases et se caractérise par la présence des îlots CpG non méthylés. Elle correspond en générale à une région du génome qui contient des gènes capables d'être transcrits.

Parallèlement à la compaction de l'ADN, les modifications d'histones sont impliquées dans la régulation de l'activité de la chromatine.

2) Régulation par les modifications d'histones

Les histones conventionnelles sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles. En effet, elles peuvent être modifiées dans la partie N-terminale de la protéine. Les acides aminés concernés sont des arginines, des lysines, des sérines, des

thréonines ou encore des tyrosines. Il existe différentes modifications d'histone : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation et la glycosylation. La **figure 21** montre la localisation des quatre modifications les plus décrites dans la littérature.

Figure 21: *Localisation des 4 principales modifications d'histones.*
(acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination).
Seule la partie N-terminale des 4 histones conventionnelles est représentée.
(http://www.theses.ulaval.ca/2005/22435/ch02.html).

Chaque type de modification d'histone présent dans les nucléosomes est associé à une ou plusieurs activités fonctionnelles de la chromatine. En effet, la modification de certains résidus d'histone permet la formation d'une chromatine plus ouverte (accessible) ou condensée (inaccessible) suivant le type de modification.

a) Rôle de l'acétylation

C'est dans les années 60 que l'acétylation des histones a été découverte. Il s'agit de l'ajout d'un groupement acétyl (CH_3-C(O)-) issu de l'acétylcoenzyme A sur les amines des résidus lysines en position N-terminale. Cette addition a pour conséquence la neutralisation de la charge positive de l'acide aminé. Cette neutralisation mène à une diminution de l'interaction entre l'histone et l'ADN chargé négativement (**figure 22**). La réaction est catalysée par des acétyltransférases (HAT) et est réversible. La réaction inverse est effectuée par des déacétyltransférases (HDAC).

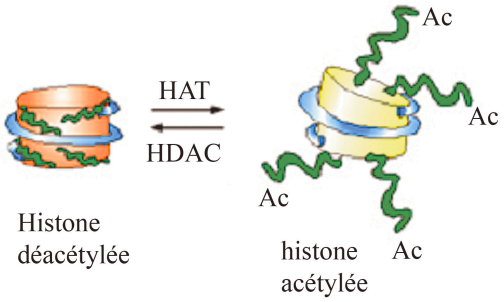

Figure 22 : *Acétylation des histones sur les résidus lysine.*
Cette modification d'histone neutralise une charge positive de l'histone. Cela entraîne une diminution de l'interaction ADN-histone au niveau de la partie N-terminale des histones.

Cette modification est à l'origine d'un changement de conformation du nucléosome. Un nucléosome contenant des histones non acétylées est plus stable qu'un nucléosome ayant des histones acétylées. Ce dernier est donc plus accessible aux facteurs de transcription (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1993). En effet, l'acétylation des histones est associée à une activation de la transcription (Hebbes *et al.*, 1988). De nombreuses études ont montré que l'hétérochromatine est pauvre en acétylation des histones (Gilbert *et al.*, 1999; Jeppesen *et al.*, 1992 ; O'Neill *et al.*, 1995). Jeppesen *et al*. montrent que le chromosome X inactif est hypoacétylé (Jeppesen *et al.*, 1993). En revanche, les régions d'euchromatine sont enrichies en acétylation des histones (O'Neill *et al.*, 1995). Cependant, il existe une exception. Turner *et al*. montrent que l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 serait associée à une répression de la transcription (Turner *et al.*, 1992). Les HATs et les HDACs sont recrutées par des facteurs de transcription. Dans ce cas, elles agissent soit en tant qu'activateurs, soit en tant que répresseurs de la transcription. L'acétylation a également un rôle dans l'assemblage de la chromatine, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Iizuka *et al.*, 2003).

b) Rôle de la méthylation

La méthylation a été décrite pour la première fois en 1964 (Murray, 1964). Cette modification se caractérise par l'ajout d'un ou plusieurs groupement méthyl (CH3-) sur l'amine de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une arginine. Les lysines et arginines concernées par cette modification sont situées sur la partie N-terminale des histones H3 et H4. Les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées (**figure 23**A). Les arginines peuvent seulement être mono- ou di-méthylées (**figure 23**B). Les histones méthyltransférases sont les enzymes responsables de cette modification. De grands progrès ont été réalisés dans

l'identification de ces enzymes. Elles sont réparties en trois classes (Shilatifard, 2006). La première classe comprend les histones méthyltransférases contenant un domaine SET. Ce domaine est nécessaire pour transférer des résidus méthyl sur des lysines. Ces enzymes sont impliquées dans la méthylation des lysines 4, 9, 27, 36 de l'histone H3 et 20 de l'histone H4. La deuxième classe ne possède pas de domaine SET. Elle intervient dans la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3. La dernière classe méthyle les arginines 2, 17, 26 de l'histone H3 et 3 de l'histone H4. Il existe deux types d'enzyme qui méthylent les arginines. Les enzymes de type I méthylent les arginines de façon asymétrique, les enzymes de type II de façon symétrique (Zhang *et al.*, 2001). La méthylation des histones a longtemps été considérée comme permanente. Récemment, il a été montré que cette modification est un phénomène réversible par l'action des déméthylases (Kubicek *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004). En effet, Shi *et al.* montrent que la lysine 4 de l'histone H3 peut être déméthylée. La tri-méthylation de la lysine 9 et 36 de l'histone H3 peuvent être également déméthylées (Klose *et al.*, 2006).

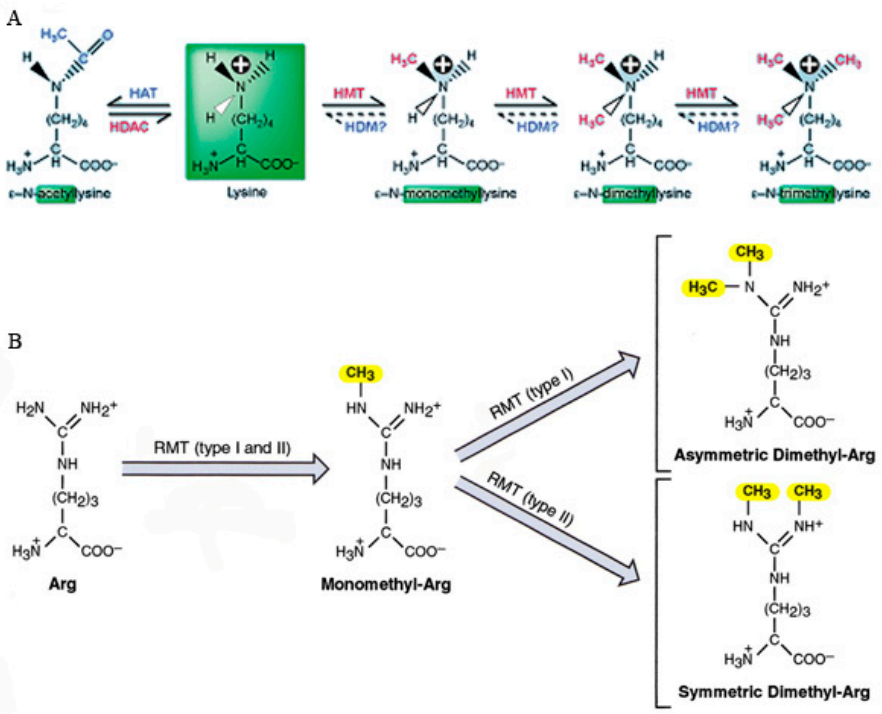

Figure 23 : *La lysine et l'arginine peuvent être méthylées.*
(A), la lysine de l'histone H3 peut être acétylée ou méthylée. L'acétylation se caractérise par l'ajout d'un groupement acétyl sur la chaîne latérale par une acétyltransférase. Les histones méthyltransférases ajoutent un, deux ou trois groupements méthyl sur les lysines. D'après (Rice et al., 2001). (B), l'arginine peut être mono-méthylée ou di-méthylée par les arginine méthyltransférases (RMT). La méthylation est asymétrique ou symétrique. D'après (Zhang et al., 2001).

La méthylation de la lysine 36 et 79 de H3 est associée à une activation de la transcription (Gerber *et al.*, 2003) alors que la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 et 20 de l'histone H4 est associée à une répression de la transcription. Il a été montré que la di et tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sont associées à un état actif de la transcription (Bernstein *et al.*, 2002 ; Santos-Rosa *et al.*, 2002 ; Schneider *et al.*, 2004) mais aussi à un état inactif (Briggs *et al.*, 2001 ; Spada *et al.*, 2005). Comme pour la méthylation de la lysine 4, la méthylation de la lysine 9 de H3 est associée à une répression et à une activation de la transcription. Il a été montré dans la littérature que l'histone H3 méthylée sur la lysine 9 provoque le recrutement de la protéine HP1 (Protéine de l'hétérochromatine 1) (Lachner *et al.*, 2001). Le degré de méthylation de la lysine 9 dépend des domaines chromatiniens (Rice *et al.*, 2003). La di-méthylation est présente dans l'euchromatine et dans l'hétérochromatine facultative alors que la tri-méthylation est présente dans l'hétérochromatine péricentrique (Peters *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré la présence de la méthylation de la lysine 9 de H3 dans le chromosome X inactif (Boggs *et al.*, 2002 ; Mermoud *et al.*, 2002). Heard *et al.* suggèrent un rôle précoce de cette modification dans le processus d'inactivation du chromosome X (Heard *et al.*, 2001). Cependant, il a été montré récemment que cette modification est également présente dans des gènes transcrits (Vakoc *et al.*, 2005). En effet, les auteurs montrent que la méthylation de la lysine 9 de H3 est présente dans des régions pouvant être transcrites. Ces dernières données suggèrent que les composants de l'hétérochromatine peuvent jouer un rôle dans la transcription des gènes et montrent ainsi la grande plasticité des histones.

c) Les autres modifications d'histone

La phosphorylation se caractérise par l'ajout d'un groupement phosphate ($-PO_3^{2-}$) sur le groupement hydroxyle des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Les enzymes responsables de cette modification sont les kinases (Hsu *et al.*, 2000). D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension du rôle de la phosphorylation dans la réparation de l'ADN, la transcription et la condensation des chromosomes. En effet, l'histone H2A est phosphorylée suite à une lésion de l'ADN. Fernandez-Capetillo *et al.* ont montré que l'histone H2B est phosphorylée lorsque les cellules sont exposées à des radiations ioniques ou à un traitement par un laser (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). La phosphorylation de H3 est impliquée à la

fois dans la transcription (Nowak *et al.*, 2004) et dans la division cellulaire (Sauve *et al.*, 1999).

L'ubiquitination se traduit par l'ajout d'une protéine, l'ubiquitine, sur des lysines. Elle concerne principalement la lysine 119 de l'histone H2A et la lysine 120 de l'histone H2B (Osley *et al.*, 2006). De nombreuses études ont montré que l'ubiquitination des histones H2A et H2B est fortement présente dans des régions de la chromatine transcriptionnellement actives (Levinger *et al.*, 1982 ; Nickel *et al.*, 1989). Il semblerait également que l'ubiquitiniation joue un rôle dans l'établissement de la chromatine silencieuse (Huang *et al.*, 1986). En effet, des études récentes ont montré la présence de l'histone H2A ubiquitinée dans le chromosome X inactif (de Napoles *et al.*, 2004). Il existe des protéines similaires à l'ubiquitine. Ce sont les protéines SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifier) (Gill, 2004). Elles peuvent être attachées sur des résidus lysine, c'est la sumoylation. La sumoylation est impliquée dans la répression de la transcription (Shiio *et al.*, 2003). Les autres modifications d'histones (l'ADP-ribosylation, la glycosylation et la biotinylation) pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes.

Toutes ces modifications d'histones sont liées à une perturbation de la structure de la chromatine. En effet, ces modifications altèrent la charge des histones et changent leur structure. Les modifications d'histone sont donc largement impliquées dans la régulation de l'activité de la chromatine. Certaines modifications sont associées à l'activation de la transcription, d'autres à la répression. La substitution d'une histone conventionnelle par un variant d'histone est également un autre moyen de régulation. En effet, la participation de ces variants d'histone dans un nucléosome est actuellement considérée comme une modification des propriétés fonctionnelles de la chromatine.

3) Régulation par les variants d'histone

Le variant H2A.X semble impliqué dans la réparation de l'ADN endommagé (Rogakou *et al.*, 1999). H2A.X pourrait contribuer à la signalisation des défauts de la réplication de l'ADN. Une étude a montré que l'inhibition de la réplication entraîne une accumulation de H2A.X dans les fourches de réplication dont la progression est arrêtée (Ward *et al.*, 2001). De plus, H2A.X participe au maintien de la stabilité du génome et au contrôle du développement de tumeurs (Bassing *et al.*, 2003). La délétion d'un seul allèle H2A.X

augmente la susceptibilité au développement d'un cancer en absence de p53 (Celeste *et al.*, 2003).

H2A.Z joue un rôle essentiel dans le développement. En effet, Faast *et al.* ont montré que l'invalidation du gène codant pour H2A.Z est létale chez la souris (Faast *et al.*, 2001). H2A.Z semble participer à la fois à la répression (Dhillon *et al.*, 2000) et à l'activation des gènes (Santisteban *et al.*, 2000). En effet, il semblerait que H2A.Z entraîne une déstabilisation du nucléosome. Cette déstabilisation serait nécessaire pour permettre la transcription (Abbott *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré que H2A.Z est présent dans des promoteurs de gènes inactifs et qu'il est occasionnellement enlevé de ces promoteurs lorsqu'ils deviennent actifs (Larochelle *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2005a). H2A.Z joue donc un rôle important dans l'activation et dans la répression de la transcription.

La localisation préférentielle de macroH2A dans le chromosome X inactif suggère que macroH2A pourrait être impliqué dans le processus d'inactivation du chromosome X (Costanzi *et al.*, 2000). Angelov *et al.* ont montré que la partie NHR de macroH2A empêche la fixation du facteur de transcription NF-κB (Angelov *et al.*, 2003) et qu'elle est responsable de l'inhibition de l'initiation de la transcription (Doyen *et al.*, 2006a). Ma *et al.* montrent que la perte de la méthylation des îlots CpG au niveau de l'hétérochromatine péricentrique entraîne une redistribution à cet endroit de macroH2A (Ma *et al.*, 2005). Toutes ces données suggèrent donc un rôle de macroH2A dans la répression de la transcription.

Contrairement à macroH2A, H2A-Bbd semble favoriser la transcription. En effet, il a été montré que H2A-Bbd n'empêche pas le passage de l'ARN Polymérase II (Angelov *et al.*, 2004). Le nucléosome qui contient H2A-Bbd est moins stable que le nucléosome contenant H2A (Gautier *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que ce variant favorise l'acétylation des histones, modification associée à la transcription et facilite la transcription (Doyen *et al.*, 2006b).

Comme pour les modifications d'histones, chaque variant a un rôle précis dans la fonction de la chromatine. L'association des modifications d'histones entre elles engendre différentes combinaisons possibles. Ces combinaisons sont à l'origine du « code histone ».

4) Le code histone

Le code histone représente un mécanisme de régulation fondamentale de la chromatine (Jenuwein *et al.*, 2001). Ce « code » serait lu par des protéines régulatrices, ce qui

aboutirait à la formation d'un état particulier de la chromatine (actif, permissif, inactif). De nombreuses études ont montré qu'une modification d'histone peut activer ou inhiber l'apparition d'une autre modification (**figure 24**). Par exemple, dans le cas de l'histone H3, la phosphorylation de la sérine 10 inhibe la méthylation de la lysine 9 (Rea *et al.*, 2000). En revanche, cette phosphorylation favorise l'acétylation de la lysine 9 et 14 ou la méthylation de la lysine 4 (Cheung *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2002 ; Lo *et al.*, 2000). De façon similaire, la déacétylation de la lysine 14 de H3 facilite la méthylation de la lysine 9 (Nakayama *et al.*, 2001). Toutes ces modifications concernent uniquement l'histone H3. Mais il existe également des corrélations entre histones différentes. En effet, il a été montré chez la levure que l'ubiquitination de l'histone H2B entraîne la méthylation de la lysine 4 et 79 de l'histone H3 ce qui aboutit à une répression de la transcription (Briggs *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002).

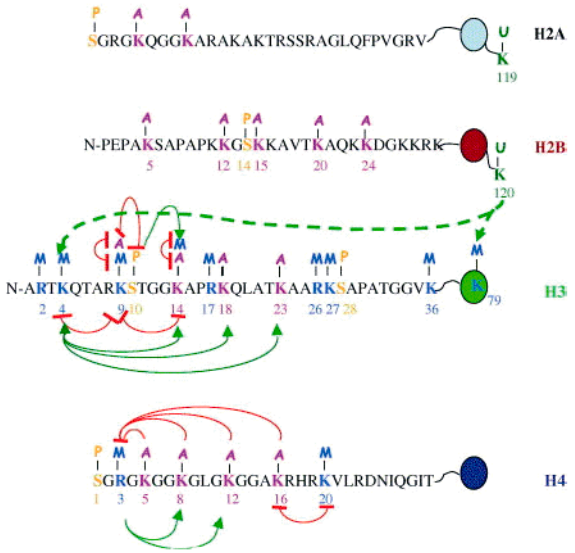

Figure 24 : *Relation entre les différentes modifications.*
Les flèches vertes montrent les modifications compatibles et les flèches rouges les modifications incompatibles. D'après (Santos-Rosa et al., 2005).

Il existe une relation entre les variants et les modifications d'histone. En effet, il a été montré par immunoprécipitation que macroH2A est associé à une hypoactétylation de l'histone H3 (Chakravarthy *et al.*, 2005). De façon plus précise, la partie NHR de macroH2A entraîne une inhibition de l'acétylation des histones (Doyen *et al.*, 2006a). Contrairement à macroH2A, le variant H2A-Bbd est principalement localisé dans les zones riches en histones H4 acétylées sur la lysine 12 (Chadwick *et al.*, 2001b). Tout comme les histones canoniques, les variants d'histones peuvent être modifiés. Ces modifications participeraient au code

histone. Chu *et al.* montrent que macroH2A1.2 peut être ubiquitiné, méthylé et phosphorylé (Chu *et al.*, 2006). H2A.X est rapidement phosphorylé dans des noyaux ayant subi des radiations ionisantes (Rogakou *et al.*, 1999) ou dans des noyaux en apoptose (Rogakou *et al.*, 2000). Une inhibition de la phosphorylation de H2A.X perturbe l'espacement régulier des nucléosomes (Kleinschmidt *et al.*, 1991). Le variant H2A.Z peut être acétylé sur différentes lysines chez la levure. L'acétylation serait impliquée dans l'assemblage de nucléosome contenant H2A.Z au niveau des promoteurs durant la transcription (Millar *et al.*, 2006). En revanche, aucune modification (acétylation, méthylation et ubiquitination) de H2A n'est présente sur H2A-Bbd (Bao *et al.*, 2004).

Le nucléosome a une composition en histones qui varie suivant l'activité et la position de la chromatine. Mais, la régulation de l'activité de la chromatine ne s'effectue pas uniquement à travers la composition du nucléosome. Des facteurs extérieurs interviennent sur la conformation de la chromatine.

5) Régulation par des complexes de remodelage

Les complexes de remodelage sont des facteurs qui affectent la chromatine en induisant des changements de conformation du nucléosome. Ils utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour modifier la structure du nucléosome. Cette modification de structure se traduit par une altération de l'interaction entre l'ADN et les histones en sein du nucléosome (Becker, 2002; Boyer *et al.*, 2000). Ces facteurs ont la capacité de déplacer un nucléosome le long de la chromatine. Ils peuvent agir par deux méthodes sur le nucléosome. Le nucléosome peut « glisser » sur la chromatine. Ce procédé est appelé déplacement en *cis*. Lorsque le nucléosome est transféré sur un autre fragment d'ADN, il s'agit d'un déplacement en *trans* (Perche *et al.*, 2003) (**figure 25**).

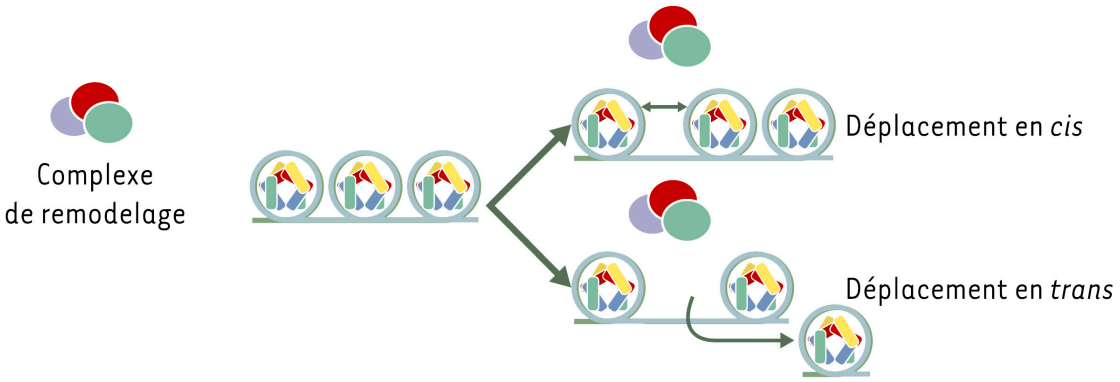

Figure 25 : *Déplacement des nucléosomes par les complexes de remodelage.*
Le déplacement en cis correspond au glissement du nucléosome le long de la chromatine. Lorsque le nucléosome est transféré sur un autre fragment d'ADN, c'est un déplacement en trans. D'après (Perche et al., 2003).

Les facteurs de remodelage sont des complexes multiprotéiques qui existent chez tous les eucaryotes. Il existe trois grandes familles de complexes de remodelage : la famille SWI2/SNF2, la famille ISWI et la famille CHD (Neely *et al.*, 2002). Ils sont impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine et notamment de la transcription grâce à leur capacité à déplacer les nucléosomes. En effet, le déplacement des nucléosomes peut augmenter ou diminuer l'accès de certains facteurs comme les facteurs de la transcription sur la chromatine. Mais les complexes de remodelage ne sont pas capables de déplacer tous les nucléosomes. En effet, Angelov *et al.* ont montré que le complexe de remodelage SWI/SNF ne peut pas déplacer un nucléosome contenant macroH2A (Angelov *et al.*, 2003) ni un nucléosome contenant H2A-Bbd (Angelov *et al.*, 2004).

La régulation de l'activité de la chromatine s'effectue donc par différents mécanismes. La compaction de la chromatine est un frein pour l'accessibilité de l'ADN par des facteurs de transcription. Les différentes combinaisons possibles entre les modifications d'histones correspondent à un code qui détermine si la chromatine est accessible ou non aux facteurs de transcription. La présence des variants modifiés ou non complexifie ce code. Les facteurs de remodelage participent également à la régulation de l'activité de la chromatine.

OBJECTIFS

La biogenèse des ribosomes est une des activités centrales pour la survie et pour la prolifération cellulaire. C'est un processus complexe qui est initié à l'intérieur du nucléole. Il débute avec la transcription par l'ARN Pol I des gènes ribosomiques. Les ARN synthétisés sont alors maturés par des protéines non ribosomiques puis associés à des protéines ribosomiques pour former chez l'homme les sous-unités 60S et 40S du ribosome. Ces sous-unités sont alors exportées vers le cytoplasme pour former un ribosome mature.

La base de la biogenèse des ribosomes repose donc sur la régulation de l'expression de l'ARN pré-ribosomique. La nucléoline et macroH2A joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques. MacroH2A est le seul variant dont la présence a été mise en évidence dans le nucléole (Andersen *et al.*, 2002). Il est généralement associé à un état silencieux de la chromatine (chromosome X inactif). Il a été montré que cette répression avait deux cibles : l'inhibition de l'acétylation des histones et l'inhibition du remodelage de la chromatine. La nucléoline permet le remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF de nucléosomes contenant macroH2A (Angelov *et al.*, 2006). De plus, cette protéine est une chaperonne d'histone qui possède une activité transcriptionnelle de type FACT. La nucléoline a un rôle dans la transcription et dans la maturation de l'ARN pré-ribosomique (Ginisty *et al.*, 1999). Il a été montré que la nucléoline réprimait la transcription par l'ARN Pol I et cela de façon indépendante de la séquence de l'ARN transcrit (Roger *et al.*, 2002). L'objectif de ce travail est donc de définir et d'ouvrir des voies méthodologiques pour mettre en évidence le rôle de macroH2A et de la nucléoline dans la régulation de l'expression des ARNr.

Pour étudier le rôle de macroH2A dans la régulation de l'expression des gènes, nous utiliserons un système cellulaire original, celui de la carpe commune, dont l'adaptation aux conditions climatiques (étés chauds / hivers froids) requiert des changements importants dans l'expression génique. Nous analyserons le niveau d'expression des modifications d'histone et de macroH2A en fonction des conditions climatiques. Pour caractériser l'action de macroH2A dans ces cellules, nous utiliserons une technique basée sur l'observation par microscopie de fluorescence de chromatine étirée. L'objectif est d'observer le long de la chromatine la présence de macroH2A, son organisation spatiale et son association avec des modifications caractéristiques de la chromatine.

Nous étudierons également le rôle global de la nucléoline dans la cellule, notamment son importance dans la structure du nucléole et dans la transcription Pol I. Pour cela, nous

étudierons les effets d'une diminution de l'expression de la nucléoline par ARN interférant sur la structure du nucléole ainsi que sur la transcription des gènes ribosomiques.

Chapitre 2 : RESULTATS

La régulation de l'expression des gènes est en relation avec la structure et la composition en histone de la chromatine. Les modifications d'histones ainsi que le remplacement des histones canoniques par des variants sont deux moyens de réguler l'activité de la chromatine comme la transcription, la réplication et la réparation. Chaque modification a un rôle précis dans la régulation de la chromatine. Ainsi, l'acétylation des histones est associée à une activation de la transcription. La méthylation est plus généralement associée à une répression de la transcription. Il en est de même pour les variants d'histones. MacroH2A est associé à une répression de la transcription alors que H2A-Bbd favorise une activation de la transcription.

Il existe une relation entre la transcription des gènes ribosomiques et la structure du nucléole. En effet, il a été montré que l'inhibition de facteurs impliqués dans la transcription Pol I entraîne une perturbation de la structure du nucléole. Par exemple, l'inhibition du facteur TIF-A, facteur indispensable à l'initiation de la transcription Pol I, est associée à une perturbation de la structure du nucléole (Yuan *et al.*, 2005). Un résultat similaire est obtenu chez les plantes lorsque l'expression de la nucléoline est inhibée (Pontvianne *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que la régulation de l'expression des gènes ribosomiques est un processus fondamental.

Pour étudier la relation qui existe entre la composition en histone et l'activité de la chromatine, nous avons utilisé le modèle de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). Ce poisson doit s'adapter au changement de température entre l'hiver et l'été. Au niveau cellulaire, le plus important changement observé durant le processus d'acclimatation au froid se situe au niveau du nucléole. Le réarrangement nucléolaire entraîne une baisse de la synthèse des ribosomes puisque la transcription des gènes ribosomiques est fortement diminuée (Vera *et al.*, 1993). Nous cherchons à mettre en évidence les mécanismes principaux mis en jeu dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques au cours de l'acclimatation.

I) Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish.

Rodrigo Pinto, **Corinne Ivaldi**, Mauricio Reyes, Cécile Doyen, Flore Mietton, Fabien Mongelard, Marco Alvarez, Alfredo Molina, Stefan Dimitrov, Manuel Krauskopf, Maria Ines Vera, Philippe Bouvet.

(Dans cette partie, j'ai réalisé l'étude de l'expression de macroH2A en fonction des conditions climatiques.)

Au cours de l'acclimatation de la carpe aux conditions hivernales, la structure du nucléole change et l'expression des gènes ribosomiques est diminuée. Les mécanismes moléculaires responsables du changement de structure du nucléole et de la diminution de l'expression des gènes ribosomiques ne sont pas connus. Le changement d'expression de ces gènes en hiver doit être associé à une modification de la composition de la chromatine. Ainsi, nous avons mesuré le niveau d'expression de certaines modifications d'histone. La formation d'hétérochromatine est liée à la présence d'histone méthylée sur la lysine 4, 9, 27, 36, 79 (histone H3) et lysine 20 (histone H4) (Sims *et al.*, 2003). Le niveau de méthylation sur la lysine 20 de l'histone H4 ne varie pas entre l'hiver et l'été ce qui suggère que cette modification d'histone n'est pas responsable du changement d'expression des gènes. Le niveau de l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H3 ainsi que la mono-méthylation de la lysine de H3 sont plus importants en été. Ces données sont en accord avec le fait qu'il y ait une forte activité transcriptionnelle en été. En revanche, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est augmentée pendant les conditions hivernales, ce qui est en accord avec un enrichissement de l'hétérochromatine en hiver.

Le variant macroH2A a été montré comme étant associé à une répression de la transcription. Une analyse protéomique indique que macroH2A est présent dans le nucléole (Andersen *et al.*, 2002). Toutefois, il n'a pas été montré que ce variant est associé à l'ADNr ou participe à la répression des ADNr. L'analyse de l'expression de ce variant montre que cette expression est différente selon la température. L'expression de macroH2A est très faible en été et forte en hiver. Ce résultat suggère que le changement d'expression de certains gènes ainsi que la formation de chromatine condensée durant les conditions hivernales sont liés à

une augmentation de l'expression de macroH2A. Le changement d'expression des gènes et la réorganisation de la chromatine sont dus à une modification de la composition en histone et non pas à une augmentation de marqueurs de l'hétérochromatine. Il a été montré que les gènes ribosomiques réprimés sont méthylés sur les résidus CpG (Santoro *et al.*, 2001). Cette méthylation joue un rôle dans l'établissement de l'hétérochromatine. L'augmentation de macroH2A est associée à une hyperméthylation des ilôts CpG sur les promoteurs des gènes ribosomiques. Ces données suggèrent que macroH2A est un facteur important dans la réorganisation de la structure chromatinienne et dans la régulation de l'expression des gènes suivant les conditions climatiques.

PUBLICATION

Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish

Rodrigo Pinto[a], Corinne Ivaldi[b], Mauricio Reyes[a], Cécile Doyen[b,c], Flore Mietton[c], Fabien Mongelard[b], Marco Alvarez[a], Alfredo Molina[a], Stefan Dimitrov[c], Manuel Krauskopf[a], Maria Ines Vera[a], Philippe Bouvet[b,*]

[a] *Millennium Institute for Fundamental and Applied Biology and Biological Sciences Department, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile*
[b] *Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS-UMR 5161 and Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France*
[c] *Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche cedex, France*

Received 1 September 2005; accepted 13 September 2005

Available online 28 September 2005

Edited by Frances Shannon

Abstract **Adaptation to cold and warm conditions requires dramatic change in gene expression. The acclimatization process of the common carp *Cyprinus carpio* L. in its natural habitat has been used to study how organisms respond to natural environmental changes. At the cellular level, adaptation to cold condition is accompanied by a dramatic alteration in nucleolar structure and a down regulation of the expression of ribosomal genes. We show that the enrichment of condensed chromatin in winter adapted cells is not correlated with an increase of the heterochromatin marker trimethyl and monomethyl K20H4. However, the expression of the tri methyl K4 H3 and of the variant histone macroH2A is significantly increased during the winter season together with a hypermethylation of CpG residues. Taking into account the properties of macroH2A toward chromatin structure and dynamics and its role in gene repression our data suggest that the increased expression of macroH2A and the hypermethylation of DNA which occurs upon winter-acclimatization plays a major role for the reorganization of chromatin structure and the regulation of gene expression during the physiological adaptation to a colder environment.**
© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Histone variant; MacroH2A; Chromatin; Acclimatization; Nucleolus

1. Introduction

Eurythermal fish acclimatization occurring during seasonal changes requires gene expression adjustments to provide the homeostatic condition for survival [1–3]. *Cyprinus carpio* L. lives in a natural environment submitted to a wide range of temperature conditions during winter and summer representing a good experimental system to study adaptation to cold condition on poikilothermic vertebrates [4–6]. Transcriptomes studies of different tissues issue from cold adapted carps indicate that a large number of cDNA (over 3400) were affected by cold [6]. At the cellular level, the most dramatic change that occurs during the acclimatization process is observed in the nucleolus (Fig. 1). In summer, the nucleoli have a reticulated aspect containing numerous intranucleolar clumps of condensed chromatin. In contrast, in winter, the nucleoli appear as compact masses surrounded by a thick layer of condensed chromatin. These nucleolar rearrangements reveal profound changes in ribosomal biogenesis, like transcription of ribosomal DNA genes that is strongly down regulated, as a consequence of seasonal environmental variations [1]. The molecular mechanisms responsible for the nucleolar rearrangements and the down regulation of ribosomal gene expression are still not known.

Rearrangement of chromatin structure and the regulation of gene expression could be achieved through different mechanisms. Post-translational histone modification and the chromatin remodeling process could be two ways to activate or inactivate specifically gene expression [7–11]. The expression of specific proteins like HMGB1 during the temperature cycle may also regulate global transcription rate [12]. Recently, it was also suggested that the incorporation of histone variant within chromatin could be an other way to regulate transcription [13,14]. For example, the histone variant H2A.Z is implicated in both gene activation [15] and gene silencing [16]. The incorporation of the histone variant H2ABbd into the histone octamer confers lower stability to the H2ABbd nucleosomes and affects nucleosomal DNA organization [17,18]. Since the residues of conventional H2A, which are targets for post-translational modifications, are mutated in H2ABbd, one could expect the function of this histone to be regulated in a distinct way [19]. In vitro transcription experiments have reported that the incorporation of this histone variant in chromatin was associated with an increase in histone acetylation and in transcription [17,20].

MacroH2A is another histone variant whose incorporation into chromatin has been associated with repression of transcription. MacroH2A possesses a C-terminal extremity called the non-histone region (NHR) which is nearly three times the size of H2A [21–23]. Immunofluorescence data suggested that mH2A is enriched in different regions including the inactive X chromosome [21,24–26] and recent proteomic studies indicated that macroH2A was also present in nucleoli [27–29]. In vitro studies have clearly demonstrated that the incorporation of macroH2A within nucleosomes impeded chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF [30] and the Gal4-VP16/p300 dependant transcription initiation (Doyen

*Corresponding author. Fax: +33 4 72 72 80 16.
E-mail address: pbouvet@ens-lyon.fr (P. Bouvet).

0014-5793/$30.00 © 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.febslet.2005.09.019

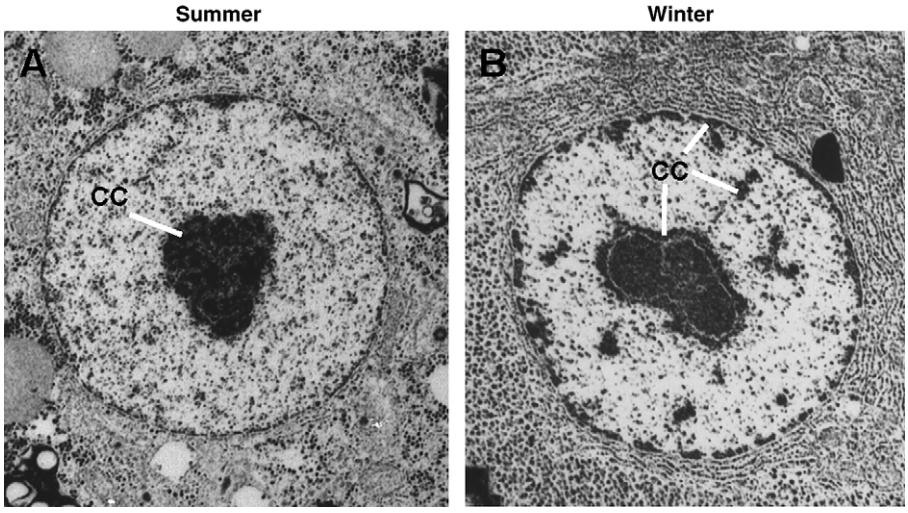

Fig. 1. The nucleolar structure is drastically modified upon acclimatization. Ultrastructural analysis of liver cells from summer (A) and winter (B) adapted carps. During the cold season the nucleolar compartment undergoes a profound rearrangement with the formation of perinucleolar condensed chromatin (CC).

et al., submitted). Interestingly, this repression of transcription is solely determined by the NHR of macroH2A (Doyen et al., submitted). The presence of macroH2A within the nucleoli suggest that macroH2A could be involved in the regulation of expression of ribosomal DNA genes, however, macroH2A has not been yet found associated with rDNA.

In this report, we describe that under the physiological condition of the acclimatization process, the expression of macroH2A and the methylation state of DNA are drastically affected. These data suggest that macroH2A could be an important factor for the global reorganization of chromatin domain and the regulation of gene expression during the acclimatization process.

2. Material and methods

2.1. Cell fractionation, protein purification and analysis

Male carp (*C. carpio*) were captured and maintained at the seasonal summer-(20–22 °C) and winter-(8–10 °C) environmental conditions [1]. Nuclear extracts were performed essentially as described previously [29]. Tissue lysates were prepared in HB buffer (250 mM Sucrose, 3 mM $CaCl_2$, 1 mM PMSF in20 mM Tris pH 7.4) and centrifugated at 1500 rpm per 10 min at 4 °C in a Sorvall rotor HB6. The pellet was collect and washed with PBS at least for three times. Then, the nuclear fraction was applied on a cushion of 0.8 M Sucrose and centrifugated for 10 min at 2400 rpm on the HB6 rotor. Following quantification of the nuclear proteins, they were electrophoretically separated by SDS–PAGE and subsequently transferred to nitrocellulose. Immunoblots were probed using antibodies against either macroH_2A (1/3000), H_2A (1/250), trimethyl K20H4 (1/1000, Abcam), Monomethyl K20H4 (1/1000, Abcam), MeK36H3 (1/1000, Abcam), Me3K4H3 (1/1000, Abcam) and developed using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

2.2. RT-PCR and macroH2A cloning

A 900 pb fragment from the macroH2A2 gene was amplified using primers oligonucleotides (CmacroR) (ATCTTGGCCATCTCCTGCAGGTA) and CmacroF (GTCTACATGGCAGCTGTCATTGA) derived from a macroH2A sequence obtained from *Danio rerio* [31], using 4 μg of total RNA extracted from liver of winter-acclimatized carp. RT-PCR product was cloned into vector pGEM-T (Promega) and sequenced. Gene Bank Accession No. DQ173494.

2.3. Immunofluorescence

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min at room temperature)and permeabilized for 15 min with 0.1% Triton-X 100 inPBS. After three washes with PBS/Tween 20 (0.1%),slides were preincubated in TNB blocking buffer (0.1 M Tris–HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% Blocking Reagent (w/v)) for 30 min at room temperature, then incubated overnight with a 1/100 dilution of macroH_2A antibody in TNB buffer. Slides were washed three times in TNT buffer (0.1 M Tris–HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) and then incubated for 2 h at room temperature with FITC conjugated anti rabbit antibody (Biosource). Slides were washed three times again with TNT and incubated 5 min with DAPI (KPL). After DAPI incubation, slides were washed three times for 10 min on PBS and mounted on glycerol (Merck). Images were obtained using an Olympus BX41 microscope with fluorescence source coupled to an Olympus digital camera.

2.4. Methylation at the promoter of rDNA

1 μg of DNA extracted from liver tissues from each season was digested with 20 U of *Hpa*II enzyme before PCR amplification using four different primers in three combinations, in order to evaluate the CCGG site at positions −30 and +45. For quantification, PCR was performed with LightCycler (Roche). The relative resistance to *Hpa*II digestion was calculated by normalizing the amount of DNA amplified with a pair of primers (−28/−10; +24/+45) located between the two studied CpG residues.

3. Results and discussion

3.1. Reorganization of nucleolar structure upon acclimatization

As a natural process, acclimatization involves a seasonal reprogrammation of molecular and cellular functions [5,6,12] for the adaptation of the cells to opposed seasonal conditions. A striking cellular change can be visualized by electron microscopy of hepatocyte cells of winter (W) and summer (S) carps (Fig. 1). The nucleolar organization is clearly different in these two physiological conditions. In winter-adapted carp, the fibrillar component appears as a unique mass surrounded by several granular caps whereas in summer-adapted carp the fibrillar component reach the surrounding granular masses by forming few granular cordons. In the hepatocyte nucleolus of summer-adapted carp, the condensed chromatin appears as structures formed by filaments that are found inside the

nucleolar body. In contrast, in winter-adapted carp the condensed chromatin associated with the nucleolus appears as densely-contrasted masses that are mainly located around the nucleolus, within the nucleoplasm and attached to the nuclear membrane. A recent analysis using acetylation method with the TdT-immunogold labelling procedure has clearly detected an enrichment of condensed chromatin around the nucleolus in winter-adapted cells (Thiry et al., submitted). These changes in nucleolar ultrastructure reflect variations in the expression of rRNA gene which is higher in summer-adapted carp than in winter-adapted carp [1].

3.2. Detection of heterochromatin markers and of macroH2A histone variant

The dramatic change of chromatin organization during acclimatization, and the accumulation of condensed chromatin in winter adapted carp must be accompanied by modification of chromatin composition. It has been shown that heterochromatin formation is intimately linked to histone methylation, in particular of Lys4, Lys9, Lys27, Lys36, Lys79 on H3 and Lys20 on H4 [32]. To determine if the accumulation of condensed chromatin in winter carp was correlated with an increased of these histone modifications we used different antibodies against histone H4 and H3 modifications (Fig. 2). Antibodies against mono and tri methyl K20 histone H4 have been used to determine if the expression of these heterochromatin markers was modified during acclimatization. Hepatocytes nuclear extracts were prepared from winter (W) and summer (S) adapted carps and used for western blotting. Interestingly, none of the heterochromatin mono and tri methyl K20H4 marker shows significant difference between winter and summer conditions, indicating that these histones modifications are probably not associated with the drastic reorganisation of chromatin and the regulation of gene expression during this process. We next looked at the expression of the tri methyl K4H3 modification which is generally associated with active gene [33], however, recent reports indicate that it could also be associated with heterochromatin region [34] or that these modification could be found flanking the heterochromatin region [35]. Interestingly, we found that the tri methyl K4H3 is significantly more expressed in winter conditions (Fig. 2) which could then be in agreement with the enrichment of heterochromatin in winter. The acetylation level of K12H4 and the mono methylation of K36H3 which are modifications usually associated with gene activation, seems more important in the summer condition (Fig. 2), which could be also in agreement with a higher transcriptional activity during that period.

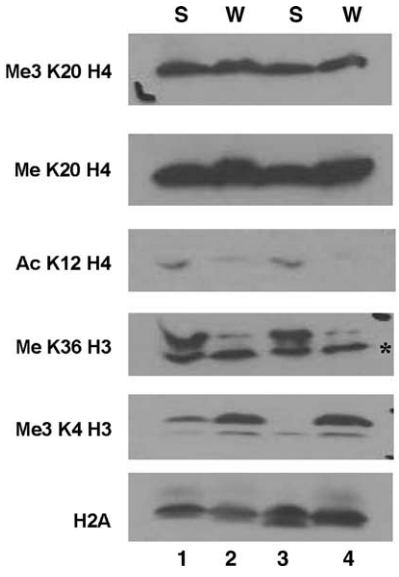

Fig. 2. Histone H4 and H3 modification during acclimatization. Liver nuclear protein extracts were prepared from summer (lanes 1 and 3) or winter (lanes 2 and 4) adapted carps and used in western blotting experiments. Antibodies against trimethyl and monomethyl K20 H4, and triMeK4H3 were used as markers of heterochromatin. Acetyl K12 H4 and MeK36H3 were used as markers of euchromatin. The asterisk in the MeK36H3 panel indicates a non-specific band detected by the antibody as described by Abcam (Ab9048). The same extracts were also probed with an antibody against H2A histone. Each lane corresponds to a different fish. Analysis of other individual fish showed similar pattern (data not shown).

Incorporation of histone variant could be another way to regulate chromatin structure and function [13,14]. One of these variants, macroH2A has a structural and particular localization suggesting that its incorporation within specific chromatin domains could be involved in gene silencing. Immunofluorescence studies indicate that macroH2A is preferentially located on the inactive X chromosome [21,24–26] and macroH2A could be involved in generation or maintenance of the hypoacetylated state of the histones (Doyen et al., submitted) suggesting that macroH2A could be an important factor for the establishment or maintenance of repressed chromatin together with other epigenetic chromatin markers [36–38]. Furthermore, recent proteomic studies of the nucleolar compartment have identified the variant histone macroH2A within the nucleolar compartment [27–29]. However it has not been shown yet that macroH2A is associated with rDNA sequences or that it is involved in the silencing of rDNA. In order to determine if the expression of macroH2A could play a role in the reorganization of chromatin, we undertook to characterize the expression of macroH2A in these two extreme physiological conditions. We first cloned and sequenced carp macroH2A2 (Gene Bank accession number DQ173494; data not shown). Sequence analysis showed that the H2A-like and NHR domains of carp macroH2A2 are 87% and 67% identical, respectively, to the human and mouse protein.

To analyze the level of macroH2A2 mRNA in liver cells from winter and summer adapted carps we performed RT-PCR using total RNA (Fig. 3A). This experiment revealed that the expression of macroH2A2 mRNA was drastically different under these two conditions. MacroH2A2 mRNA was undetectable in the summer condition, whereas it was well expressed in cells isolated from winter-adapted animals. This data suggest that the down regulation of the expression of many genes (including ribosomal DNA genes) and the formation of condensed chromatin during acclimatization to the winter conditions are correlated with an increased expression of the macroH2A2 variant mRNA. To determine if this increased level of macroH2A2 mRNA was associated with an increased protein level a western blot analysis was performed on nuclear protein extracts from both conditions (Fig. 3B). Although the global pattern of nuclear protein is very similar in summer and winter-adapted liver cells (Fig. 3B, compare lane 1 and 2), the macroH2A protein level shows a significant increase (7–8-fold) during the winter acclimatization (compare

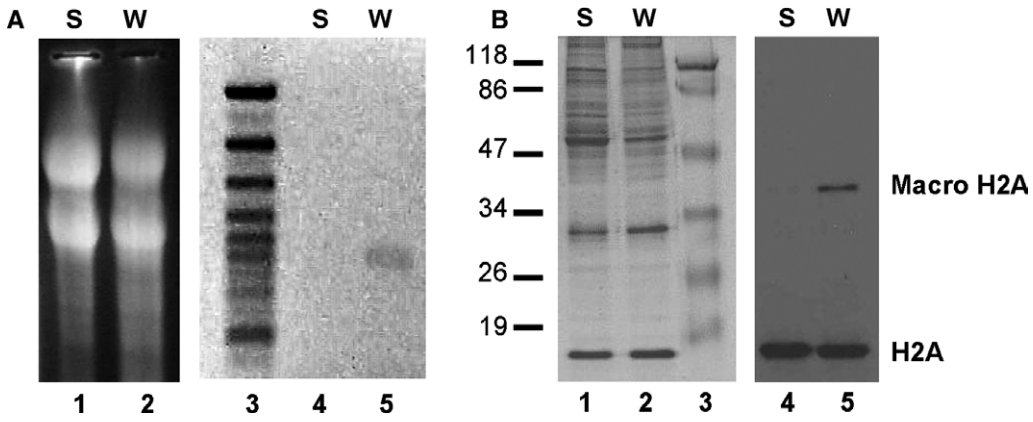

Fig. 3. macroH2A expression in summer-and winter-acclimatized liver cells. (A) RT-PCR analysis of macroH2A mRNA expression. Total RNA extracted from liver of summer- (S, lane 1) and from winter-adapted (W, lane 2) carp were used for the RT-PCR. Lanes 1 and 2 show the ethidium bromide staining of the RNA. After the RT-PCR reaction as described in the material and methods, the PCR product was analyzed on a 1% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining (lanes 4–5). (B) Western blot analysis of the expression of macroH2A. Nuclear proteins from liver of winter (W)- and summer (S)-adapted carps were stained with Coomassie (lanes 1 and 2) and then probed with antibodies against macroH2A (lanes 4 and 5). The same blot was then probed with antibodies against H2A. Molecular weight is shown in lane 3.

lane 4 and 5). This increased macroH2A protein level is not the result of a general increased of histone proteins since the same blot revealed with an anti-H2A antibody show that the expression of H2A protein is not affected during the winter-acclimatization process. Immunofluorescence analysis was then performed to further characterize the expression of macroH2A in winter and summer acclimatized cells (Fig. 4). In summer cells no significant signals could be detected in nuclei confirming the data of the western blot (Fig. 3B) showing that the amount of macroH2A protein is very low in these cells. In contrast, in winter cells, a strong signal is found throughout the nucleus. Altogether these data show that during the winter acclimation, the dramatic change in gene expression and chromatin organization is accompanied by a modification of histone composition and not by an increase of classical heterochromatin markers histone H4 mono and trimethyl modifications.

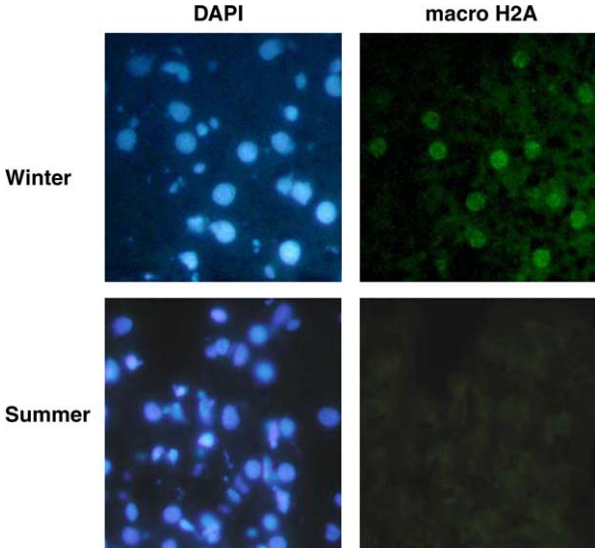

Fig. 4. Immunofluorescence analysis of the expression of macroH2A. Liver fragments from winter- and summer-acclimatized animals were frozen then treated for staining with macroH2A antibodies. Nuclei were stained with DAPI.

3.3. Ribosomal DNA genes are hypermethylated in winter-adapted hepatocytes

Many studies have pointed out the importance of cytosine base methylation of CpG dinucleotides for the establishment of constitutive heterochromatin and in some case of facultative heterochromatin. It has been shown that silent ribosomal genes are methylated at CpG residues [39]. Since the dramatic change in nucleolar structure during the winter-acclimatization process is accompanied by the down regulation of ribosomal gene expression, we wanted to determine if this down regulation of ribosomal gene expression was correlated to a modification of CpG methylation within the ribosomal promoter sequence. DNA was extracted from cells exposed to both conditions, submitted to *Hpa*II digestion (inhibited by methylation) then analysed by PCR using different pairs of primers (Fig. 5). We analyzed two different CCGG sites at −30 and +45. If these CpG residues are methylated, DNA will be resistant to *Hpa*II cleavage, and a PCR product will be detected. As a control we used a pair of primers (−28/−10; +24/+45) located between the 2 studied CpG residues, which will give a PCR product independently of the methylation state of DNA. As shown in Fig. 5, DNA isolated from winter-adapted animals is significantly more resistant to *Hpa*II cleavage than DNA isolated from summer adapted animals. Quantitative PCR indicated a 3.5-fold (−30) and 3.2-fold (+45) resistance to cleavage in winter compared to summer conditions, indicating that in cold condition, ribosomal DNA promoter sequences are hypermethylated.

Our study shows that the expression of the histone variant macroH2A is drastically modified upon acclimatization. MacroH2A interferes with transcription factor binding, SWI/SNF nucleosome remodeling [30] and polymerase II transcription (Doyen et al. submitted) potentially through enhancing the interaction of the histone octamer with the nucleosomal DNA [40]. Furthermore, the C-terminal non-histone domain of macroH2A may be involved in ADP-ribosylation of chromatin with potential implications for transcriptional silencing

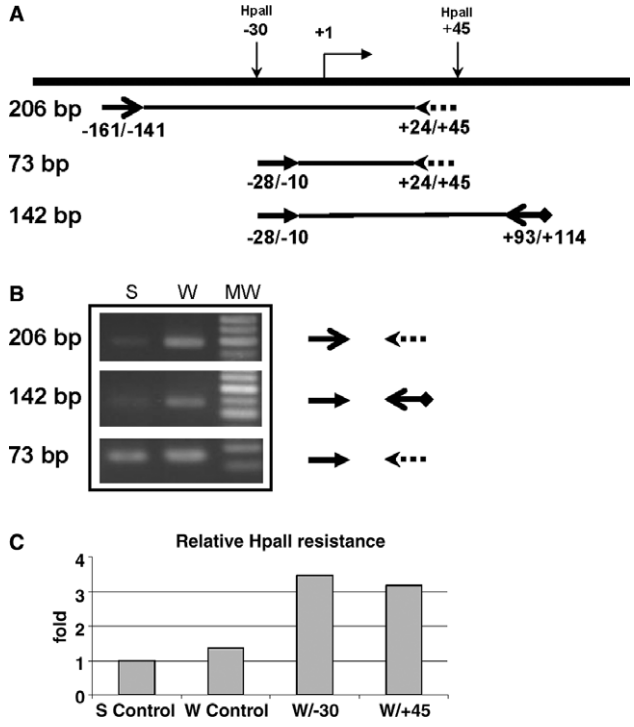

Fig. 5. Ribosomal genes are hypermethylated in winter-acclimatized animals. DNA was extracted from hepatocytes cells isolated from summer (S) and winter (W) acclimatized carps and methylation at CpG site was analyzed by QPCR after *Hpa*II digestion. (A) Map of the carp ribosomal DNA gene with the position of the −30 and +45 studied CpG sites. Primers used for the PCR reactions are indicated together with the length of the expected PCR product. (B) PCR analysis with the different primers as indicated on the left on the figure. On the right of the panel are indicated the length of the PCR fragment. Amplification with internal primers (lower panel) is used as internal control since amplification is independent on the presence of the methylated state of DNA. (C) Quantification of the PCR assays.

[14,40]. Recent reports indicate that macroH2A may accumulate in constitutive heterochromatin and could contribute to maintaining its repressed state [37] and that it could contribute to transcriptional silencing acting in synergy with other repressive markers such as DNA methylation, histone deacetylation and methylation [36]. Expression of macroH2A seems to vary greatly according to the cell type [41], and in this study, we show that its expression is drastically up regulated during the cold acclimatization process. The regulated expression of histones variants, and in particular of macroH2A as shown in this study, could be key regulatory factors for the global reorganization of chromatin structure and the regulation of gene expression.

Acknowledgement: This work was supported by grants from the CNRS, Région Rhone Alpes, ECOS-CONICYT C02B01, FONDECYT 1040197, Universidad Andres Bello (DIUNAB 37-04).

References

[1] Vera, M.I., Norambuena, L., Alvarez, M., Figueroa, J., Molina, A., Leon, G. and Krauskopf, M. (1993) Reprogramming of nucleolar gene expression during the acclimatization of the carp. Cell. Mol. Biol. Res. 39, 665–674.
[2] Vera, M.I., Kausel, G., Barrera, R., Leal, S., Figueroa, J. and Quezada, C. (2000) Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 beta subunit gene in the carp. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271, 735–740.
[3] Buckley, B.A., Owen, M.E. and Hofmann, G.E. (2001) Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus Mytilus) changes as a function of thermal history. J. Exp. Biol. 204, 3571–3579.
[4] Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J. and Cossins, A.R. (1996) Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. Science 271, 815–818.
[5] Gracey, A.Y. and Cossins, A.R. (2003) Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. Annu. Rev. Physiol. 65, 231–259.
[6] Gracey, A.Y., Fraser, E.J., Li, W., Fang, Y., Taylor, R.R., Rogers, J., Brass, A. and Cossins, A.R. (2004) Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 16970–16975.
[7] Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. Curr. Opin. Genet. Dev. 9, 148–151.
[8] Travers, A. (1999) An engine for nucleosome remodeling. Cell 96, 311–314.
[9] Peterson, C.L. and Workman, J.L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 187–192.
[10] Langst, G. and Becker, P.B. (2001) Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. J. Cell Sci. 114, 2561–2568.
[11] Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98, 285–294.
[12] Podrabsky, J.E. and Somero, G.N. (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish Austrofundulus limnaeus. J. Exp. Biol. 207, 2237–2254.
[13] Kamakaka, R.T. and Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants?. Genes Dev. 19, 295–310.
[14] Ladurner, A.G. (2003) Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. Mol. Cell 12, 1–3.
[15] Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulats transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. Cell 103, 411–422.
[16] Dhillon, N. and Kamakaka, R.T. (2000) A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. Mol. Cell 6, 769–780.
[17] Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J. and Luger, K. (2004) Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. EMBO J. 23, 3314–3324.
[18] Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J. and Dimitrov, S. (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. EMBO Rep. 5, 715–720.
[19] Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. J. Cell Biol. 152, 375–384.
[20] Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2004) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. EMBO J. 23, 3815–3824.
[21] Chadwick, B.P., Valley, C.M. and Willard, H.F. (2001) Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. Nucleic Acids Res. 29, 2699–2705.
[22] Pehrson, J.R. and Fuji, R.N. (1998) Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. Nucleic Acids Res. 26, 2837–2842.
[23] Pehrson, J.R. and Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. Science 257, 1398–1400.
[24] Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. Nature 393, 599–601.

[25] Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (2001) MACROH2A2, a new member of the marcoH2A core histone family. J. Biol. Chem. 276, 21776–21784.
[26] Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R. and Brockdorff, N. (1999) Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. J. Cell Biol. 147, 1399–1408.
[27] Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. and Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. Nature 433, 77–83.
[28] Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr. Biol. 12, 1–11.
[29] Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D. and Diaz, J.J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. Mol. Biol. Cell 13, 4100–4109.
[30] Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. Mol. Cell 11, 1033–1041.
[31] Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S. and Westerfield, M. (2001) The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. Nucleic Acids Res. 29, 87–90.
[32] Sims III, R.J., Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends Genet. 19, 629–639.
[33] Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature 419, 407–411.
[34] Spada, F., Vincent, M. and Thompson, E.M. (2005) Plasticity of histone modifications across the invertebrate to vertebrate transition: histone H3 lysine 4 trimethylation in heterochromatin. Chromosome Res. 13, 57–72.
[35] Sullivan, B.A. and Karpen, G.H. (2004) Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 1076–1083.
[36] Hernandez-Munoz, I., Lund, A.H., van der Stoop, P., Boutsma, E., Muijrers, I., Verhoeven, E., Nusinow, D.A., Panning, B., Marahrens, Y. and vanLohuizen, M. (2005) Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone macroH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 7635–7640.
[37] Grigoryev, S.A., Nikitina, T., Pehrson, J.R., Singh, P.B. and Woodcock, C.L. (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. J. Cell Sci. 117, 6153–6162.
[38] Ma, Y., Jacobs, S.B., Jackson-Grusby, L., Mastrangelo, M.A., Torres-Betancourt, J.A., Jaenisch, R. and Rasmussen, T.P. (2005) DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. J. Cell Sci. 118, 1607–1616.
[39] Santoro, R. and Grummt, I. (2001) Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. Mol. Cell 8, 719–725.
[40] Abbott, D.W., Chadwick, B.P., Thambirajah, A.A. and Ausio, J. (2005) Beyond the Xi: macroH2A chromatin distribution and post-translational modification in an avian system. J. Biol. Chem. 280, 16437–16445.
[41] Abbott, D.W., Laszczak, M., Lewis, J.D., Su, H., Moore, S.C., Hills, M., Dimitrov, S. and Ausio, J. (2004) Structural characterization of macroH2A containing chromatin. Biochemistry 43, 1352–1359.

II) Localisation d'histones variants et de modifications d'histone sur une fibre de chromatine peignée.

(Ce travail a été effectué en collaboration avec F. Montel qui a réalisé tous les programmes Matlab™).

Comprendre l'organisation structurale de la chromatine dans une cellule vivante reste un des enjeux majeurs de la biologie cellulaire. L'implication de cette organisation dans la régulation de l'expression des gènes reste à ce jour largement incomprise. Les avancées dans ce domaine requièrent d'importantes investigations en biologie mais également le développement de nouvelles approches méthodologiques.

La complexité de la chromatine est due à une grande hétérogénéité dans la composition en histones des nucléosomes. Les études récentes nous ont montré que cette composition est variable. Cette variation porte sur les modifications des queues d'histones (acétylation, phosphorylation, méthylation, …) mais également sur la présence d'histones non conventionnelles. Ces histones dites histones variants sont produites et remplacent les histones conventionnelles au cours de l'activité cellulaire. Elles présentent d'importantes variations de taille et de composition en acides aminés dans les zones ne correspondant pas au motif « histone-fold ». L'ensemble de ces variations conduit à une déstabilisation physico-chimique du nucléosome qui permet l'établissement d'interactions spécifiques avec d'autres protéines nucléaires (code histone). Ces modifications sont alors les marqueurs et les acteurs d'une accessibilité modifiée à l'ADN par les machineries moléculaires (transcription, réplication, réparation et recombinaison). L'analyse de la composition de la chromatine permet donc d'établir un lien avec la fonction d'une zone chromatinienne.

Les techniques développées en biologie pour caractériser cette composition reposent principalement sur trois types d'expériences : une analyse protéomique d'un isolat (chromosome, nucléole), la visualisation 3D en microscopie de fluorescence confocale d'histones (variants ou modifiées) ou l'immunoprécipitation des histones (variants ou modifiés) d'un fragment de chromatine (ChIP). Elles permettent de mettre en évidence une colocalisation des modifications d'histone dont la précision dépend de chacune des techniques. En effet, ces trois techniques sondent des échelles spatiales très différentes : de quelques centaines de paires de bases en ChIP, au million de paires de bases pour l'analyse en

fluorescence (1/1000e du noyau est sondé) ou à des centaines de millions pour l'analyse protéomique. De plus, ces techniques ne permettent pas de rendre compte de l'organisation spatiale des variations d'histones dans le domaine spatial considéré. Une technique récemment développée consistant à aligner le long d'une surface des fibres de chromatine permet de combler ce vide méthodologique.

L'étirement de la chromatine est l'extension de la technique de peignage moléculaire de l'ADN. Le peignage moléculaire de l'ADN est une technique qui consiste à aligner en parallèle un grand nombre d'ADN sur une surface (Bensimon *et al.*, 1994). Le principe repose sur l'accrochage d'une extrémité d'un ADN sur une surface hydrophobe en milieu liquide (tampon pH 5-6) et l'étirement de cet ADN par le passage d'un ménisque air-eau (Gueroui *et al.*, 2002). La tension appliquée sur l'ADN est donc capable de l'étirer et dans certains cas de maintenir l'interaction ADN-protéine. Il est intéressant de transposer cette technique à l'étirement de la chromatine de façon à déplier les structures chromatiniennes et localiser la position des histones associées (Haaf *et al.*, 1994). Le principe est de libérer la chromatine du noyau par lyse cellulaire puis d'appliquer une force sur la chromatine via le passage d'un ménisque air-eau et d'étirer ainsi des fibres de chromatine.

La limite de résolution spatiale est alors la même que l'ADN peigné de l'ordre de 250 nm. Cette limite de résolution a deux conséquences : la visualisation d'un point lumineux peut correspondre à un grand nombre de fluorophores confondus dans la tache de diffraction et deux points pour être distingués doivent être distants au minimum de 250 nm. Toutefois la longueur bout à bout d'ADN contenue dans cette espace est beaucoup plus importante que pour le peignage moléculaire de l'ADN (environ 1000 pb) du fait de la compaction de la chromatine. Ainsi pour la fibre de 30 nm, c'est une distance de 5 nm (la hauteur d'un nucléosome) qui correspond à 1000 pb. La technique permet donc de sonder avec une précision de 60 kilobases (kb) des fibres de chromatine d'une longueur de plusieurs dizaines de microns (plusieurs centaines de millier de pb).

Une seconde limite concerne l'identification des zones observées. En l'absence d'un marqueur spécifique, les zones de chromatine observées sont inconnues. Nous avons envisagé d'identifier ces zones par hybridation de sonde (Fluorescent in situ hybridization ou FISH). Des hybridation de sondes d'ADN marquées ont été effectués avec succès sur des ADN peignés (Michalet *et al.*, 1997 ; Pasero *et al.*, 2002). Toutefois, nous n'avons pas pu mettre au point cette expérience sur chromatine par manque de temps.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés à la répartition dans la chromatine des variants macroH2A et H2A-Bbd. MacroH2A est associé à une répression de la transcription. Nous avons également choisi d'étudier H2A-Bbd, bien que non présent dans le nucléole, car ce variant a un effet inverse de macroH2A. Il est associé à une chromatine transcriptionnellement active. Pour corréler le positionnement de ces variants avec l'activité des zones chromatiniennes, nous avons observé deux modifications d'histone. L'acétylation de la lysine 12 de H4 (AcK12H4) est un marqueur d'une activité transcriptionnelle. En revanche, la tri-méthylation de la lysine 9 de H3 (3MeK9H3) est principalement un marqueur de l'hétérochromatine (répression de la transcription).

Nous avons dans un premier temps visualisé de la chromatine sans aucun marquage. Puis, nous avons visualisé séparément les variants d'histone et les modifications d'histone sur la chromatine étirée. Enfin, nous avons observé simultanément sur une même fibre de chromatine les variants avec les marqueurs de l'activité chromatinienne.

A) Visualisation d'une fibre de chromatine étirée

Nous avons reproduit au laboratoire le mode d'étirement de la chromatine mis au point par l'équipe de Sullivan *et al.* (Sullivan *et al.*, 2004). Pour obtenir de la chromatine étirée, des cellules sont tout d'abord déposées sur une lame de verre par cytocentrifugation. La cytocentrifugation permet d'obtenir une concentration élevée de cellules sur une petite surface. La lame de verre est ensuite immergée dans un tampon contenant un détergent pour obtenir la lyse des cellules. Le tampon contient également une forte concentration d'urée pour permettre la décondensation de la chromatine et une forte concentration saline pour maintenir la structure nucléosomale. La lame est ensuite extraite du tampon. Le passage du ménisque air-eau exerce une force sur la chromatine qui entraîne l'étirement de fibres sur la surface. La chromatine est marquée avec un fluorophore, le DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole). Ce fluorophore se lie au sillon mineur de l'ADN dans les régions riches en nucléotides AT. La fluorescence du DAPI est exaltée par sa liaison à l'ADN permettant ainsi d'obtenir un excellent rapport signal sur bruit. Il est classiquement utilisé en biologie cellulaire pour visualiser la chromatine. La **figure 26** montre le résultat typique de l'étirement de la chromatine de cellules HeLa. La chromatine apparaît sous forme de "toile d'araignée" (**figure 26**A). Il s'agit d'un enchevêtrement de fibres de chromatine de largeur variable étirées dans le sens du peignage. Nous pouvons observer l'émergence, à partir de ces toiles d'araignée, de

fibres isolées (**figure 26**B). Malgré leur faible intensité, elles sont parfaitement discernables du fond car nous ne sommes pas gênés par la fluorescence des autres fibres. Ce sont elles qui nous intéressent et sur lesquelles nous allons mener notre étude.

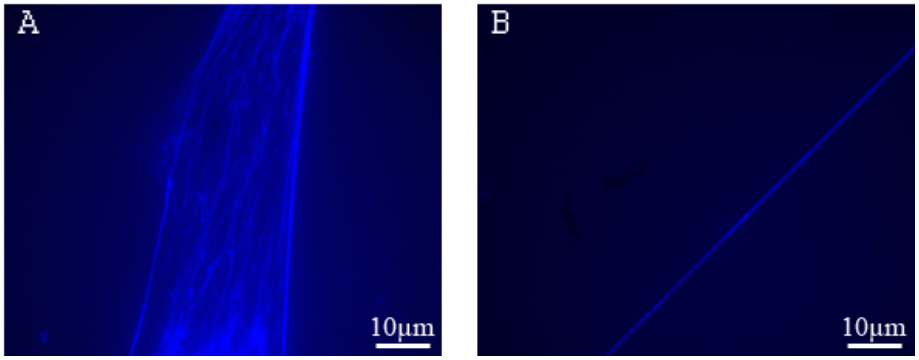

Figure 26 : *Visualisation par microscopie de fluorescence de la chromatine de cellules HeLa peignée sur une surface de verre traitée.*
(A), observation de la chromatine en « toile d'araignée » par coloration au DAPI. (B), observation d'une fibre isolée.

L'intensité de la coloration au DAPI n'est pas homogène le long de la fibre. Des variations d'intensité allant du simple au double sont observées. Ces variations sont certainement dues au fait que le DAPI présente des difficultés à pénétrer certaines zones de la chromatine. De plus, le DAPI a plus d'affinité pour les régions riches en AT (Zimmer *et al.*, 1986), nous interprétons donc ces différences d'intensité, non pas comme une variation du contenu en ADN de la fibre de chromatine, mais comme un reflet de l'hétérogénéité du marquage.

Quelle est la nature de la fibre de chromatine observée ? Comme nous le savons, la fibre de chromatine peut présenter différents diamètres. Le diamètre minimum observable semble être de l'ordre de 11 nm (forte décondensation), c'est celui du chapelet de nucléosomes. Il est de 30 nm lorsque la fibre est en présence des histones de liaison. Lorsque la fibre de 30 nm se replie sur elle-même, elle forme des structures qui ont un diamètre supérieur. Il n'est pas possible de connaître par des méthodes optiques le diamètre réel de la fibre observée du fait de la résolution optique (environ 250 nm). Nous trouvons pour l'ensemble des fibres de chromatine isolées observées un diamètre apparent de 250 nm (par ex **figure 26**B), soit l'équivalent de notre résolution optique. Cette « fibre » est trop fine pour correspondre à une structure de 300 nm (diamètre apparent de 550 nm). Elle pourrait

correspondre en réalité à une seule fibre de 30 nm ou à un chapelet de 11 nm. Fritzsche *et al*. ont observé par microscopie à force atomique (AFM) de la chromatine issue de la lyse de cellules (Fritzsche *et al.*, 1995). La lyse des cellules est réalisée dans différentes conditions. Lorsque les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon hypotonique, la chromatine observée est la fibre de 11 nm. Lorsque les auteurs augmentent la concentration en sel ou lorsqu'ils utilisent un détergent, la chromatine observée est la fibre de 30 nm. Dans notre cas, nous utilisons un tampon ayant une forte concentration en sel. Ceci conforte notre hypothèse que l'objet que nous observons est la fibre de 30 nm, même si nous ne pouvons être catégoriques. Bien sur la visualisation de la chromatine n'est pas une fin en soi. C'est plus particulièrement l'identification des composants de la chromatine qui nous intéresse ici.

B) Visualisation des variants et des modifications d'histones

1) Choix du marquage des histones visualisées

La détection repose sur un marquage fluorescent des histones. Nous avons développé deux types de marquage : l'utilisation de fluorophores couplés à des anticorps et la fusion des histones à la GFP. Ces deux méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients. La technique de détection par anticorps est tributaire de l'accès de l'anticorps primaire à l'épitope. Celui ci peut être masqué, ce qui empêche la reconnaissance de l'anticorps. De plus la méthode n'est pas quantitative, puisque seule l'amplification par l'anticorps secondaire est observée. Le couplage de protéine GFP est par contre quantitatif et la visualisation est possible quelque soit la configuration de l'ADN. En revanche le remplacement de l'histone endogène par l'histone fusionnée à la GFP n'est pas forcement uniforme le long de la fibre de chromatine. Nous utiliserons le marquage GFP pour détecter les variants d'histones et le marquage par anticorps pour détecter les modifications d'histone.

2) Détection des variants d'histone le long de la fibre étirée

a) Observation de H2A-GFP

Nous avons testé la localisation d'histones le long d'une fibre de chromatine étirée avec l'histone conventionnelle H2A (**figure 27**). Pour se faire, nous avons visualisé l'histone canonique H2A couplée à la GFP (Green Fluorescent Protein). Les cellules sont transfectées

de façon transitoire avec un plasmide codant pour la protéine H2A-GFP. Il y a donc simultanément présence dans la cellule de H2A endogène et de H2A-GFP. Nous avons en fait utilisé la protéine EGFP (E pour Enhanced) car elle possède une intensité de fluorescence plus importante que la protéine GFP. Les observations sont réalisées après vingt quatre heures de transfection de façon à permettre au moins une division cellulaire conduisant à la réplication du génome et à l'incorporation de l'histone H2A-GFP dans l'ADN. Toutefois nous ne pouvons pas exclure le fait que H2A-GFP, produite pendant la phase G1 puisse également être incorporée au cours de cette phase.

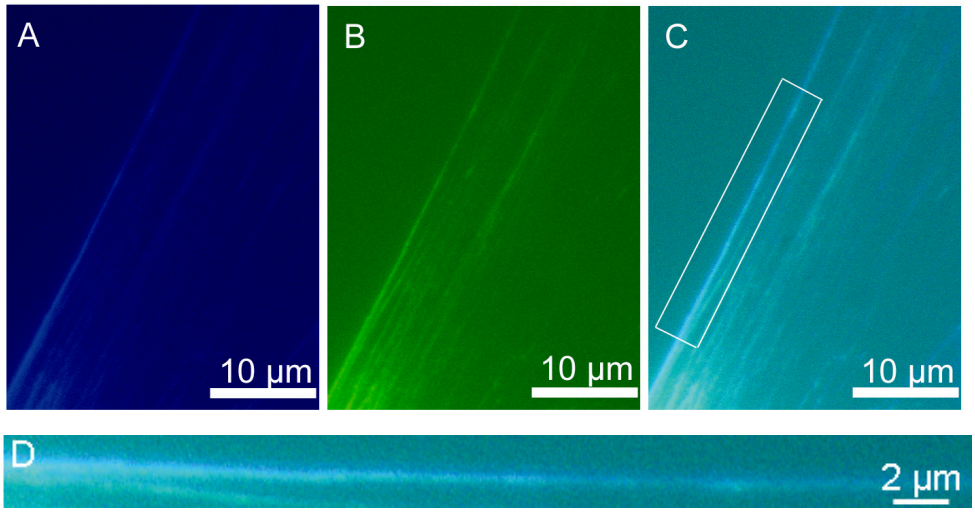

Figure 27 : *Observation par microscopie de fluorescence de H2A-GFP.*
(A), observation de la chromatine par coloration au DAPI. (B), observation de H2A-GFP. (C), superposition de (A) et (B). (D), agrandissement d'une partie de la figure C (rectangle blanc).

La **figure 27** montre que la fluorescence de H2A-GFP couvre l'ensemble de la fibre. Pour mieux visualiser le profil de H2A-GFP, nous avons agrandi une partie de la fibre de chromatine (**figure 27**D). Il n'y a pas de zone d'exclusion où l'histone serait entièrement absente, dans la limite de notre résolution optique. Toutefois des variations d'intensité le long de la fibre semble montrer que l'incorporation de H2A-GFP n'est pas uniforme le long de la fibre. Ceci est soit le reflet de la présence d'histones variant le long de la fibre, soit le reflet d'une incorporation plus difficile de H2A-GFP dans certaines zones de la chromatine (par exemple l'hétérochromatine constitutive). Ce résultat montre la faisabilité de l'expérience. Les histones fusionnées à la GFP sont capables de s'incorporer dans la chromatine et sont visualisables sur une fibre étirée.

b) Observation des variants de H2A

i) Observation de l'histone MacroH2A-GFP

Nous avons observé macroH2A-GFP suivant le même protocole que celui développé pour H2A-GFP. La **figure 28** montre la localisation de macroH2A-GFP sur une fibre de chromatine.

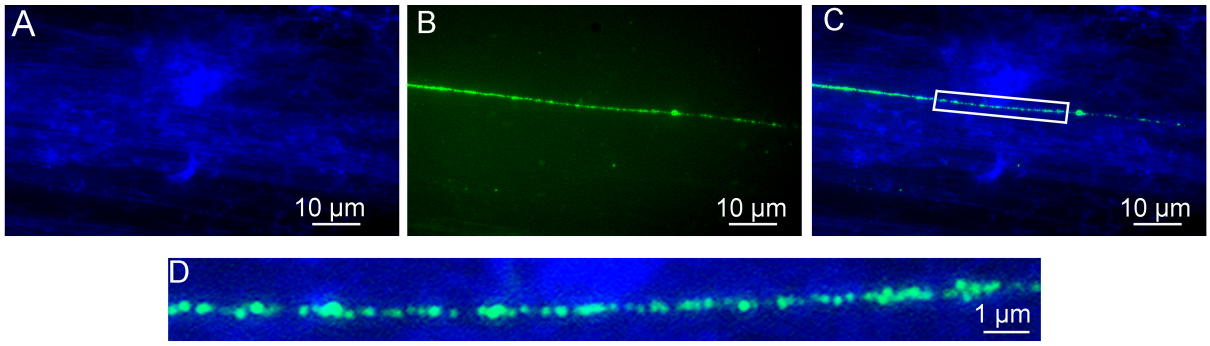

Figure 28 : *Visualisation de macroH2A-GFP sur une fibre de chromatine.*
(A), la chromatine est visible grâce à l'utilisation du DAPI. (B), observation de macroH2A-GFP. (C), superposition de (A) et (B). (D), agrandissement d'une partie de la figure C (rectangle blanc).

La répartition spatiale de macroH2A-GFP est complètement différente de celle de H2A-GFP. La **figure 28**B montre que macroH2A-GFP se présente sous forme de points lumineux résolus optiquement. Des zones d'exclusion sont clairement présentes le long de la chromatine (**figure 28**D). Ce variant se retrouve donc dans des domaines chromatiniens précis. La répartition spatiale de ces points lumineux sera analysée plus loin. Ces points semblent plus ou moins intenses selon les régions. Cela suggère que ces régions possèdent l'histone marquée en quantité variable.

Ces images montrent une différence qualitative forte entre la répartition discontinue de macroH2A le long de la chromatine et la répartition continue de H2A.

ii) Observation de l'histone H2A-Bbd-GFP

La **figure 29** montre la répartition de H2A-Bbd-GFP. Le protocole utilisé pour obtenir de la chromatine étirée contenant H2A-Bbd-GFP est identique au protocole utilisé pour l'observation de H2A-GFP et de macroH2A-GFP.

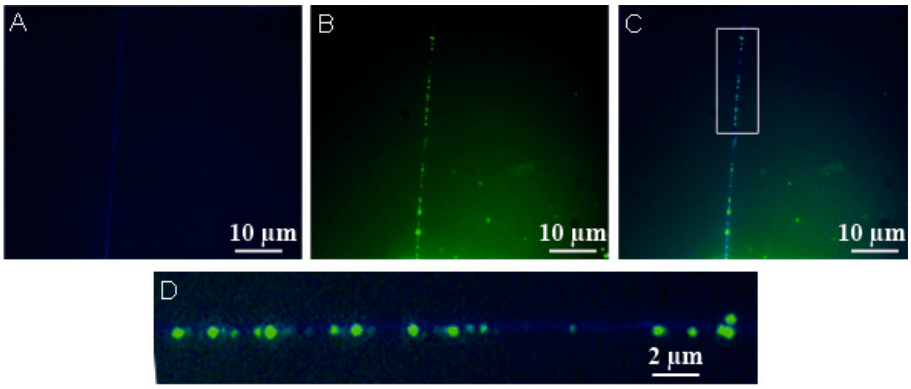

Figure 29 : *Observation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP.*
(A), observation de la chromatine (DAPI). (B), observation de H2A-Bbd-GFP. (C), superposition de (A) et (B). (D), agrandissement d'une partie de la figure C (rectangle blanc).

La **figure 29**B montre la distribution de H2A-Bbd-GFP sur une fibre de chromatine étirée. La répartition de H2A-Bbd-GFP est à nouveau différente de celle de l'histone conventionnelle. Comme pour le variant macroH2A-GFP, l'observation de H2A-Bbd-GFP se présente sous forme de points lumineux.

L'histone canonique H2A fusionnée à la GFP a une répartition plus homogène sur une fibre de chromatine étirée. En revanche, les deux variants de H2A, H2A-Bbd et macroH2A ont une distribution discontinue.

3) Observation des modifications d'histones

a) Observation de la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3

La chromatine, étirée comme précédemment, est mise en présence d'un anticorps spécifique de la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (3MeK9H3) avant d'être

colorée au DAPI. Nous avons choisi d'observer cette modification d'histone car c'est un marqueur fort de l'hétérochromatine. La **figure 30** montre un exemple de fibre obtenue.

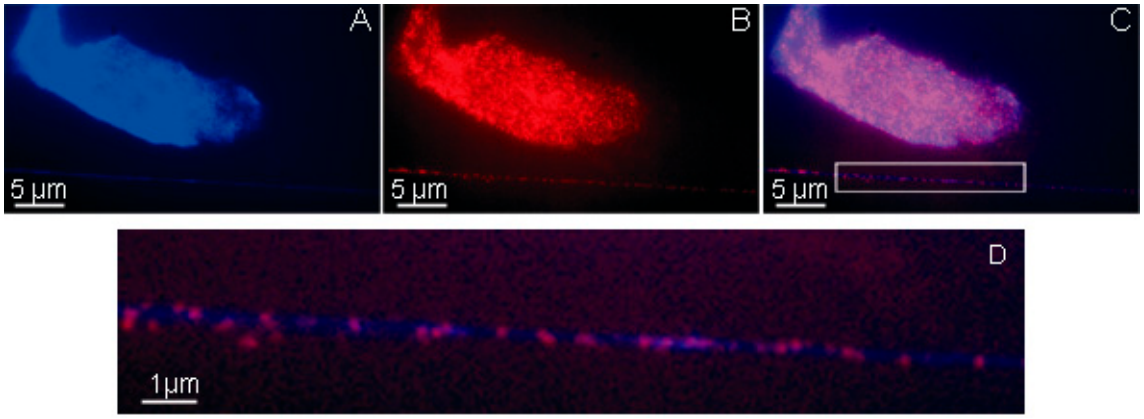

Figure 30 : *Visualisation par microscopie de fluorescence de la 3MeK9H3 sur une fibre de chromatine étirée.*
(A), visualisation de la chromatine par coloration au DAPI. (B), détection de la 3MeK9H3 par l'utilisation d'un anticorps couplé au texas red (rouge). (C), superposition de (A) et (B). (D), agrandissement d'une partie de la figure C (rectangle blanc).

La **figure 30**A montre une zone correspondant à un noyau où la chromatine forme un amas non étiré. La chromatine fixée sur la surface n'a pas été entraînée par le ménisque air-eau. La **figure 30**B montre la distribution de la 3MeK9H3 dans cette cellule qui n'a pas été lysée et sur une fibre de chromatine isolée. Pour mieux visualiser le profil de la 3MeK9H3, nous avons agrandi une partie de la fibre de chromatine (**figure 30**D). La méthylation apparaît sous forme de points lumineux tout au long de la fibre. Cette expérience montre que la répartition de la 3MeK9H3 est, tout comme pour les variants d'histone, discontinue. La 3MeK9H3 est également présente dans des domaines précis de la chromatine.

b) Observation de l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4

Pour notre étude, nous utilisons également un marqueur d'une activité transcriptionnelle, l'acétylation de la lysine 12 de H4 (AcK12H4). Pour observer la distribution de l'AcK12H4, nous avons utilisé un anticorps spécifique de cette modification. La **figure 31** montre un exemple de la distribution observée sur une fibre de chromatine de l'AcK12H4.

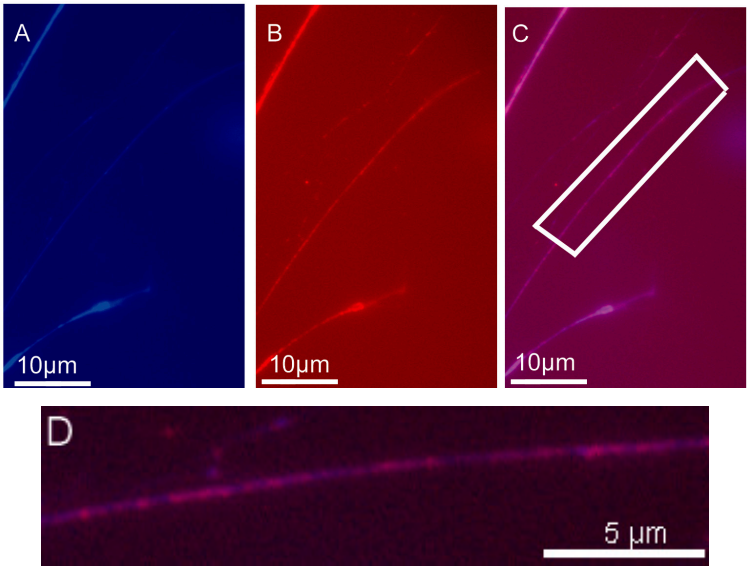

Figure 31 : *Observation par microscopie de fluorescence de l'AcK12H4.*
(A), visualisation de la chromatine colorée au DAPI. (B), visualisation de l'AcK12H4 à l'aide d'un anticorps couplé au texas red (rouge). (C), superposition de (A) et (B). (D), agrandissement de la figure C (rectangle blanc).

Sur cette figure, trois fibres de chromatine sont présentes. Nous nous intéressons à la fibre centrale car c'est la plus fine et elle possède un diamètre de l'ordre de la résolution optique. La **figure 31**D montre que l'acétylation est une modification fréquente dans la chromatine. En effet, les points correspondant à l'AcK12H4 semblent plus nombreux que pour la méthylation. Cette modification apparaît également sous forme de points lumineux mais ceux-ci sont très souvent confondus. La répartition de cette modification est donc beaucoup plus homogène que celle de la 3MeK9H3.

C) Répartition spatiale des variants et des modifications d'histone.

1) Evaluation de la distance entre deux points successifs

Pour recueillir une information quantitative, nous avons cherché à montrer s'il existe une distance caractéristique entre deux points lumineux voisins. Nous avons exclu de cette étude l'AcK12H4 pour laquelle la superposition des points lumineux rend cette analyse impossible. Nous avons systématiquement mesuré la distance entre deux points voisins. Cette

distance est toujours supérieure à 250 nm (limite de résolution) et présente une longueur maximale correspondant à la taille de la photo. Pour calculer cette distance, nous avons utilisé le logiciel Matlab™. La distance est déterminée par l'établissement d'une ligne le long de la trajectoire de la chromatine. Le centre de chaque point correspond à son maximum d'intensité le long de la fibre. La distance entre deux points successifs correspond donc à la distance entre le centre des points. La **figure 32** montre les histogrammes des distances.

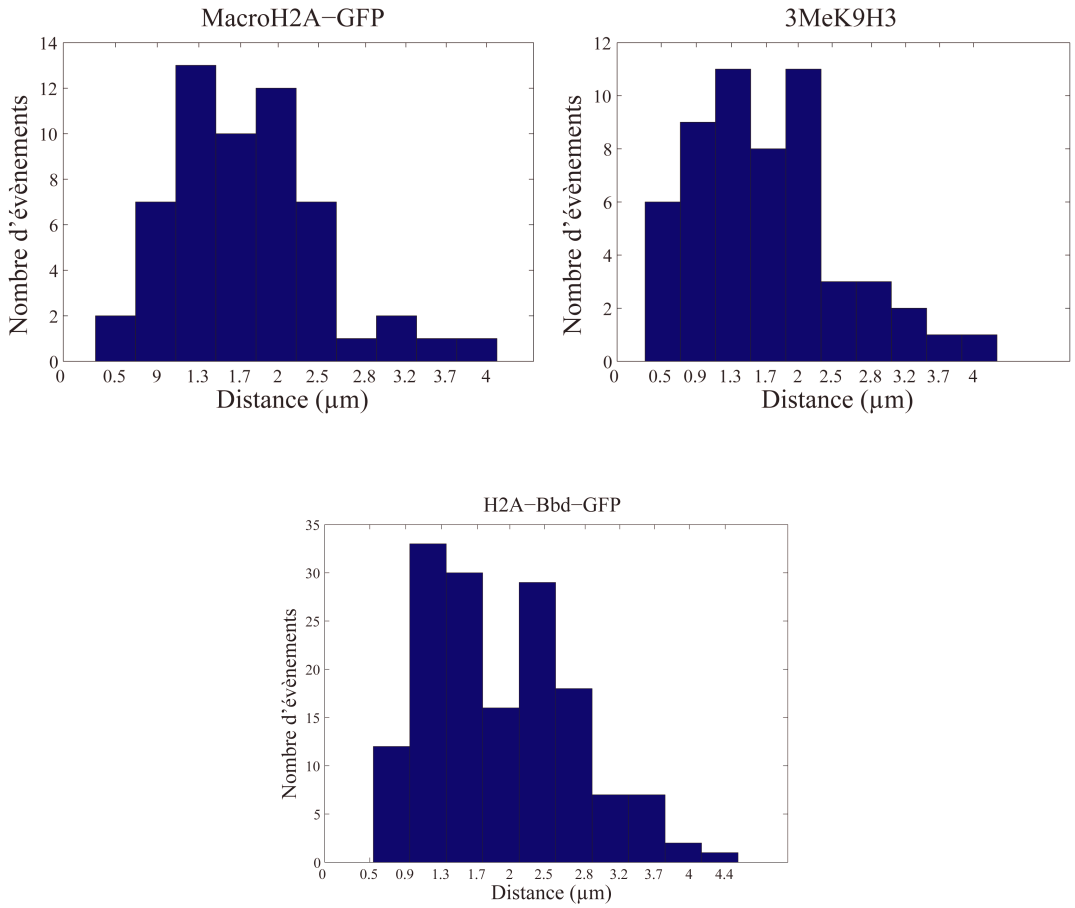

Figure 32 : *Distance entre deux points lumineux successifs.*
Cette distance est calculée à l'aide du logiciel Matlab. En abscisse, distance en µm. En ordonnée, nombre d'évènements.

Pour chaque histogramme, nous avons calculé la valeur moyenne ainsi que l'écart type des distances (**tableau 1**).

Histone	Moyenne (µm)/médiane (µm)	écart-type (µm)	nombre d'évènements
MacroH2A-GFP	1,74/1,64	0,691	67
3MeK9H3	1,7/1,71	0,832	55
H2A-Bbd-GFP	1,9/1,95	0,813	155

Tableau 1 : *Calcul de la moyenne et de l'écart type des distances*
Moyenne et écart-type des distances entre deux points lumineux successifs pour macroH2A-GFP, la 3MeK9H3 et H2A-Bbd-GFP. Le nombre de d'évènement correspond au nombre de point pris en compte pour l'analyse.

Ces valeurs nous indiquent qu'il n'y a pas clairement de distance caractéristique. La valeur de la médiane est très proche de celle de la moyenne. La distance moyenne entre deux points pour toute histone confondue (modification et variant) est de 1,78 µm. Pour une fibre de 30 nm, une distance de 5 nm correspond à 1000 pb. Ainsi, la distance entre deux points lumineux que nous observons correspond en moyenne à 350 000 pb. Le profil des histogrammes des modifications et des variants d'histone sont tous différents. De façon générale, il laisse apparaître un écart-type important et ne semble pas présenter une distance caractéristique. Nous allons utiliser un outil statistique plus puissant, l'autocorrélation, pour obtenir de ces données une information sur la fréquence d'apparition des points le long de la fibre.

2) L'autocorrélation

Alors que les histogrammes ne nous donnaient qu'une information de distance entre proche voisins, l'autocorrélation va permettre de comparer ces distances entre tous les points voisins d'une fibre. Cette analyse statistique va ainsi permettre d'augmenter le nombre d'évènements considérés et d'extraire une information plus précise. L'autocorrélation est la comparaison d'une image avec elle-même. Elle permet de détecter des régularités, des profils répétés dans un signal. Nous avons déterminé l'autocorrélation pour chaque modification et chaque variant en utilisant le logiciel Matlab™. Pour cela, nous avons établi pour chaque fibre une courbe correspondant à la trajectoire de la fibre. Cette courbe est tout d'abord comparée à elle-même. Dans ce cas, la valeur du coefficient de corrélation est proche de 1. Ensuite, la courbe est décalée. Le programme compare la courbe non décalée (position initiale) avec la courbe décalée. Dans les deux cas, il s'agit de la même courbe. S'il n'y a pas

de périodicité, la valeur du coefficient de corrélation est proche de 0. S'il y a une périodicité, la valeur du coefficient est positive et enfin s'il y a une anticorrélation, la valeur du coefficient est négative. La **figure 33** montre l'autocorrélation de macroH2A-GFP, la 3MeK9H3, H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4.

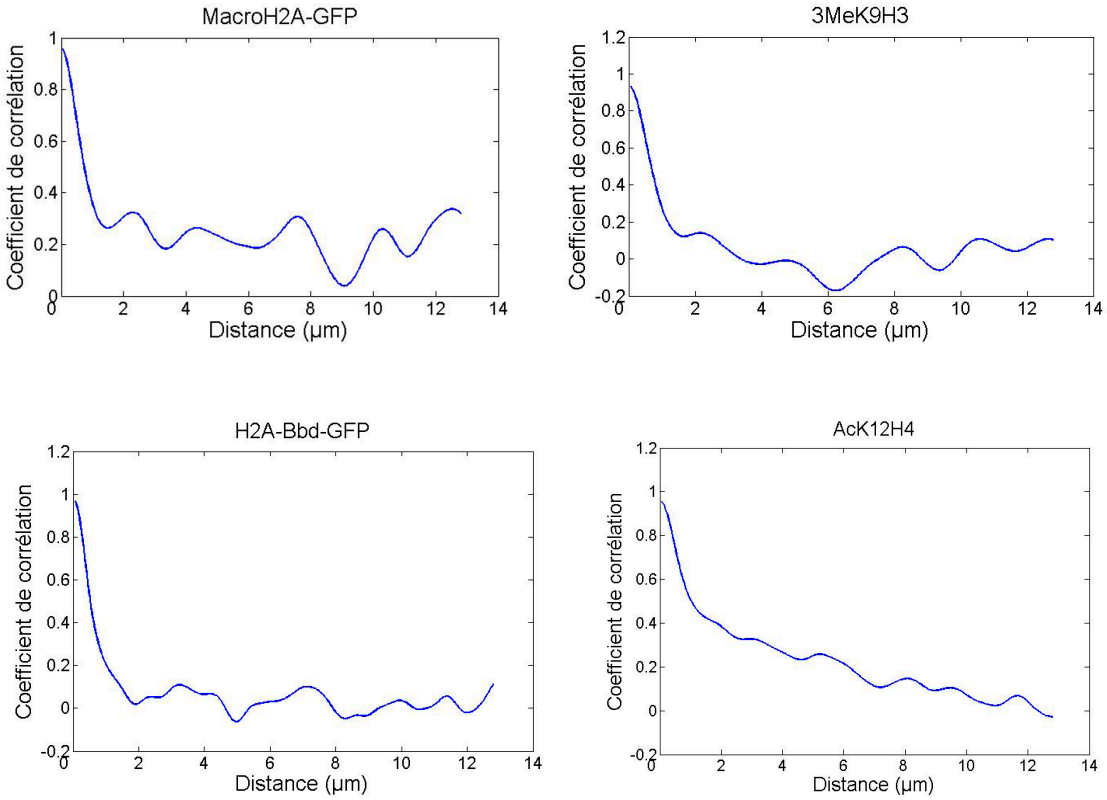

Figure 33 : *Autocorrélation pour macroH2A-GFP, la 3MeK9H3, H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4.*
L'autocorrélation est calculée à l'aide du logiciel Matlab™. En abscisse, distance de décalage. En ordonnée, coefficient de corrélation obtenu lors du décalage de la fibre.

La périodicité est ici clairement visible pour macroH2A (**figure 33**). On observe des pics de corrélation à peu près tous les 2.4 µm. Ces pics sont intenses, il représente 1/3 d'une corrélation parfaite. Ils sont assez larges, ce qui reflète une périodicité bruitée. C'est pourquoi nous ne l'avons pas directement observée sur les histogrammes précédemment présentés. Ils sont la marque d'une distribution non aléatoire des points de macroH2A. Ainsi les points de macroH2A-GFP sont préférentiellement distants de 2.4 µm. Dans le cas de la 3MeK9H3, nous retrouvons cette périodicité mais légèrement moins marquée que pour macroH2A-GFP.

La distance caractéristique est ici égale à 2.5 µm. Elle est proche de celle observée pour macroH2A-GFP.

En revanche, la répartition des points de H2A-Bbd-GFP ne donne pas de pics de corrélations clairement identifiables. La répartition des points semble donc aléatoire. Il en est de même pour l'AcK12H4. La décroissance continue du coefficient de corrélation est simplement la marque de la présence de zone homogène le long de l'ADN où les points de l'AcK12H4 ne sont pas clairement distingués.

Ainsi, par une étude statistique plus approfondie nous trouvons une distance caractéristique de positionnement pour macroH2A-GFP et pour la 3MeK9H3. Cette distance caractéristique a une valeur de l'ordre de 2.45 µm. Est ce que cette même distance reflète une colocalisation entre les histones variants et les modifications d'histone ?

D) Co-localisation entre variants d'histone et histones modifiées

Nous avons cherché à savoir s'il existe une colocalisation entre les variants et les modifications d'histone. Nous avons observé sur une même fibre macroH2A-GFP avec la 3MeK9H3, H2A-Bbd-GFP avec la 3MeK9H3 et H2A-Bbd-GFP avec l'AcK12H4.

1) MacroH2A-GFP et la 3MeK9H3

Les cellules sont transfectées avec le plasmide codant pour macroH2A-GFP. Vingt quatre heures après transfection, la chromatine étirée est mise en présence d'un anticorps spécifique de la 3MeK9H3. Grâce à un jeu de filtre, nous pouvons visualiser sur une même fibre macroH2A-GFP en vert et la méthylation en rouge. Pour localiser la 3MeK9H3, nous avons utilisé un anticorps spécifique de cette modification. La **figure 34** montre macroH2A-GFP et la 3MeK9H3 sur une même fibre de chromatine. Le variant macroH2A colocalise avec la 3MeK9H3.

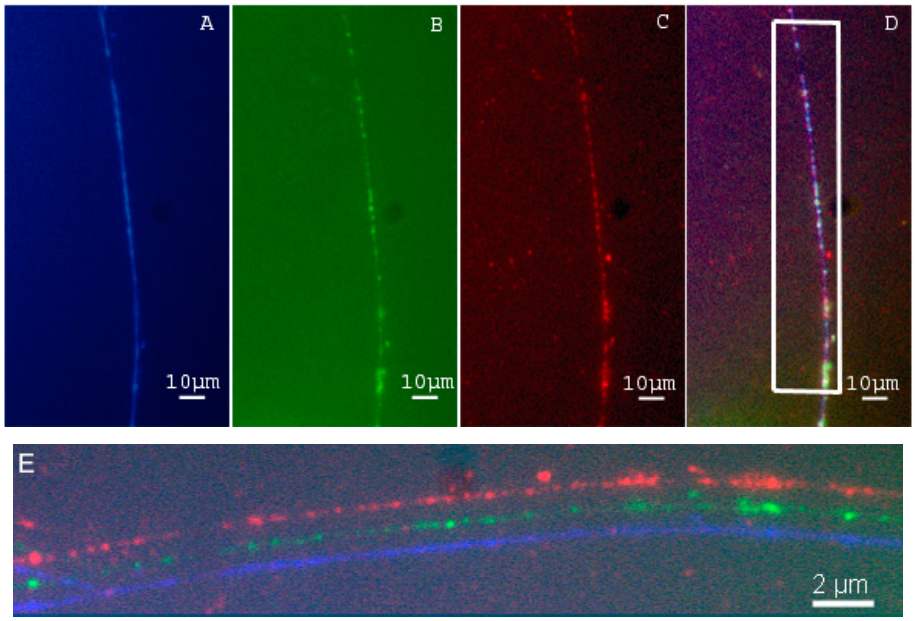

Figure 34 : *visualisation par microscopie de fluorescence de macroH2A-GFP et de la 3MeK9H3 simultanément.*
(A), observation de la chromatine par coloration au DAPI. (B), visualisation de macroH2A-GFP. (C), visualisation de la 3MeK9H3. (D), superposition de (A), (B) et (C). (E), agrandissement d'une partie de la figure D (rectangle blanc). Les fibres ont été décalées pour une meilleure observation.

2) H2A-Bbd-GFP et la 3MeK9H3

Nous avons observé sur une même fibre H2A-Bbd-GFP et la 3MeK9H3. Le protocole d'obtention de la chromatine contenant H2A-Bbd-GFP est identique à l'expérience précédente. La **figure 35** montre H2A-Bbd-GFP et la 3MeK9H3 sur une même fibre de chromatine.

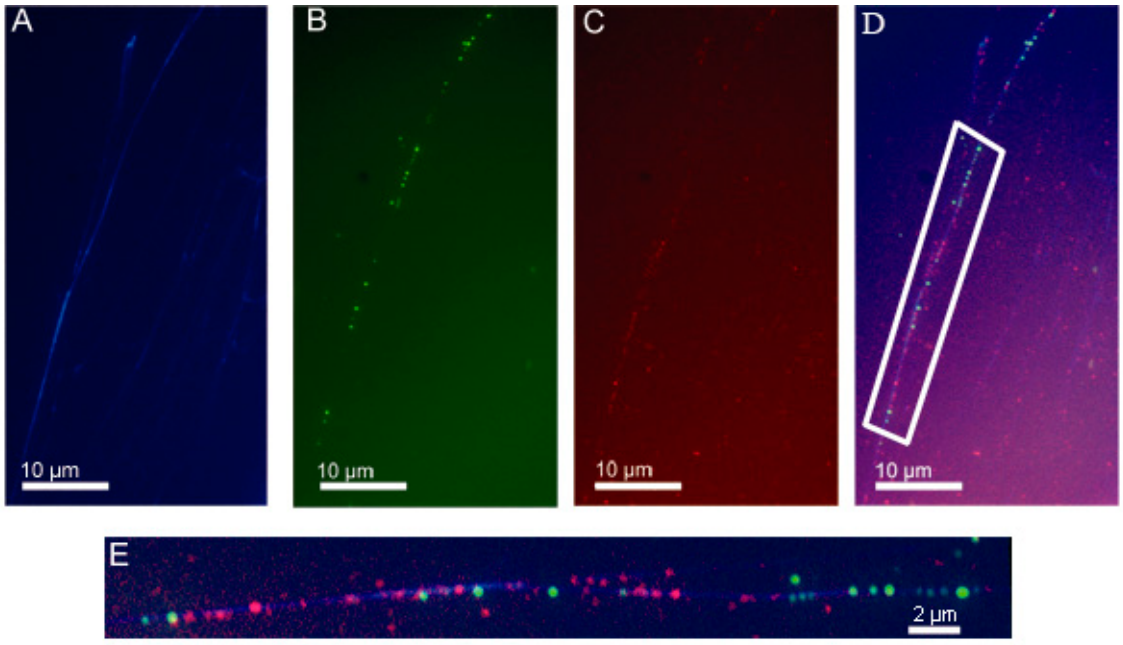

Figure 35 *: visualisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP et de la 3MeK9H3 simultanément.*
(A), visualisation de la chromatine par coloration au DAPI. (B), visualisation de H2A-Bbd-GFP. (C), visualisation de la 3MeK9H3. (D), superposition de (A), (B) et (C). (E), agrandissement d'une partie de la figure D (rectangle blanc).

Il apparaît que H2A-Bbd-GFP ne colocalise pas avec la 3MeK9H3. En effet, la zone sur la droite de la **figure 35** est riche en H2A-Bbd-GFP et pauvre en 3MeK9H3. A l'inverse, sur la gauche de la **figure 35** ainsi qu'au centre, la zone est riche en méthylation et pauvre en variant. Ainsi, loin d'observer une colocalisation, il semblerait que nous observions une exclusion spatiale entre ces deux changements d'histones.

3) H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4

Nous avons observé sur une même fibre H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H4 (**figure 36**). L'obtention de la chromatine étirée s'effectue comme précédemment. Dans cette expérience, nous avons utilisé un anticorps primaire spécifique de l'AcK12H4.

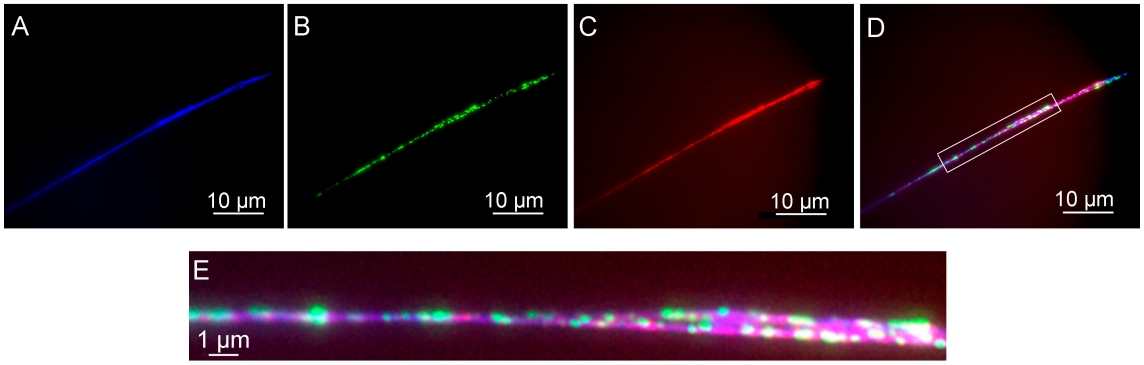

Figure 36 : *Visualisation par microscopie de fluorescence de H2A-Bbd-GFP et de l'AcK12H4 simultanément.*
(A), visualisation de la chromatine par coloration au DAPI. (B), visualisation de H2A-Bbd-GFP. (C), observation de l'AcK12H4. (D), superposition de (A), (B) et (C). (E), agrandissement d'une partie de la figure D (rectangle blanc).

Il semblerait que H2A-Bbd-GFP et l'AcK12H3 colocalisent. Cependant, cette colocalisation n'est pas totale. En effet, chaque H2A-Bbd-GFP colocalise avec cette modification. A l'inverse, l'acétylation ne colocalise pas toujours avec H2A-Bbd-GFP. Cette observation peut être due au fait que nous avons fusionné ce variant à la GFP. Ceux-ci n'occupent pas alors l'ensemble des sites de H2A-Bbd.

Ainsi par une analyse qualitative de la comparaison d'image de microscopie de fluorescence, nous pouvons mettre en évidence des colocalisations ou des exclusions entre variants et modifications d'histone. Pour analyser de façon plus quantitative la colocalisation entre variants et modifications, nous avons déterminé la corrélation croisée pour chaque couple (macroH2A-GFP et 3MeK9H3, H2A-Bbd-GFP et 3MeK9H3).

4) Analyse de la colocalisation par une méthode statistique

La corrélation croisée se base sur le même principe que l'autocorrélation. Elle permet de comparer deux images différentes d'une même fibre. Nous pourrons donc comparer l'image correspondant au variant et l'image correspondant à la modification et déterminer ainsi s'il y a une colocalisation entre ce variant et cette modification. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel Matlab™. Brièvement pour expliquer la méthode, nous établissons une courbe le long de la trajectoire de la chromatine. Le programme repère les points lumineux

correspondant au variant et à la modification. Il détermine ainsi la position de chaque point en fonction d'une origine. Le programme compare ensuite la position de tous les points correspondant au variant avec la position de tous les points correspondant à la modification. Si la colocalisation est forte entre le variant et la modification alors la valeur de la corrélation croisée est proche de 1, sinon elle est proche de zéro. Ensuite, la position des points correspondant au variant est décalée. Le programme compare de nouveau la position des points correspondant au variant avec ceux de la modification. Si la corrélation était forte lors de la première comparaison alors la corrélation de la seconde comparaison sera donc plus faible puisque les points sont décalés. La **figure 37** montre la corrélation croisée pour les couples, H2A-Bbd-GFP/3MeK9H3 et macroH2A/3MeK9H3.

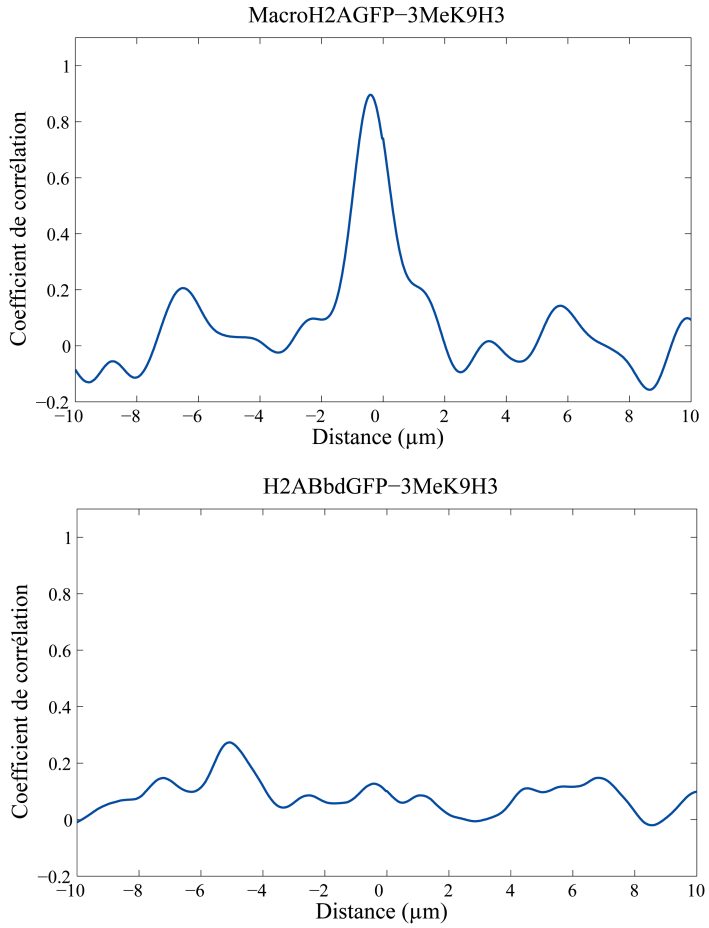

Figure 37 : *Corrélation croisée entre variant et modification.*
Corrélation croisée pour macroH2A-GFP et 3MeK9H3 et pour H2A-Bbd-GFP et 3MeK9H3. L'axe des abscisses correspond au décalage de la fibre. L'ordonnée correspond au coefficient de corrélation obtenu.

La corrélation croisée entre macroH2A-GFP et la 3MeK9H3 a une valeur proche de 0,75. C'est une valeur très importante qui fait coïncider pour chaque point de macroH2A un point de la 3MeK9H3 dans 75% des cas. Il y a donc une forte colocalisation entre macroH2A et la 3MeK9H3. Il est remarquable de voir que la périodicité observée précédemment pour le positionnement de macroH2A est encore observable sur ces courbes de corrélation croisée. En revanche, la corrélation entre H2A-Bbd et la 3MeK9H3 est quasiment nulle. Ceci reflète quantitativement que la non-colocalisation correspond en fait à une exclusion. H2A-Bbd et la 3MeK9H3 ne colocalisent donc pas et s'excluent mutuellement.

Nous avons, en utilisant une méthode originale d'étirement de la chromatine, mis en évidence plusieurs caractéristiques de l'organisation de la chromatine : *(i)* la présence de points correspondant aux variants et aux modifications d'histone le long de la fibre de chromatine alors que l'histone conventionnelle H2A est présente de façon continue, *(ii)* la périodicité de la présence des points correspondant à macroH2A-GFP et à la 3MeK9H3 le long de la fibre alors que H2A-Bbd et l'AcK12H4 semblent réparties de façon aléatoire, *(iii)* la forte co-localisation entre macro-H2A et la 3MeK9H3 le long de la fibre de chromatine et une exclusion spatiale entre H2A-Bbd et la 3MeK9H3.

III) Rôle de la nucléoline dans la structure du nucléole et dans la prolifération des cellules

(Ce travail a été réalisé en collaboration avec Iva Ugrinova et Marc Thiry pour la microscopie électronique).

La nucléoline est une protéine trouvée de façon abondante au sein du nucléole. Le nucléole est le lieu où débute la synthèse des ribosomes. La nucléoline a un rôle important dans les différentes étapes de la synthèse des ribosomes. En effet, elle intervient dans la transcription et dans la maturation du pré-ARNr. La nucléoline est une protéine fortement exprimée dans les cellules en prolifération : elle aurait un rôle important dans la croissance des cellules. Dans le but d'étudier le rôle de la nucléoline dans la structure du nucléole et dans la prolifération des cellules, nous avons utilisé la technique d'ARN interférant pour diminuer de façon significative la quantité de nucléoline dans les cellules humaines.

A) Inhibition de la nucléoline par ARN interférant

Pour inhiber spécifiquement l'expression de la nucléoline, deux petits ARN interférant (small interference RNA ou siRNA) double brin ont été conçus par la société Dharmacon. Le premier siRNA cible la séquence d'ARN correspondant au RBD de la nucléoline. Le deuxième cible le domaine N-terminal et le site de localisation nucléaire. Les siRNA sont intégrés dans des cellules HeLa et dans des fibroblastes humains par transfection transitoire. Pour vérifier que l'expression de la nucléoline chute dans les cellules transfectées, nous avons mesuré par PCR quantitative le pourcentage d'ARN messager de la nucléoline. Nous obtenons une diminution du taux d'ARN messager dès le deuxième jour de transfection (**figure 38**A). En effet, dans les cellules HeLa ainsi que dans les fibroblastes humains, l'ARN messager restant ne représente que 10 % de la quantité présente dans les cellules contrôles.

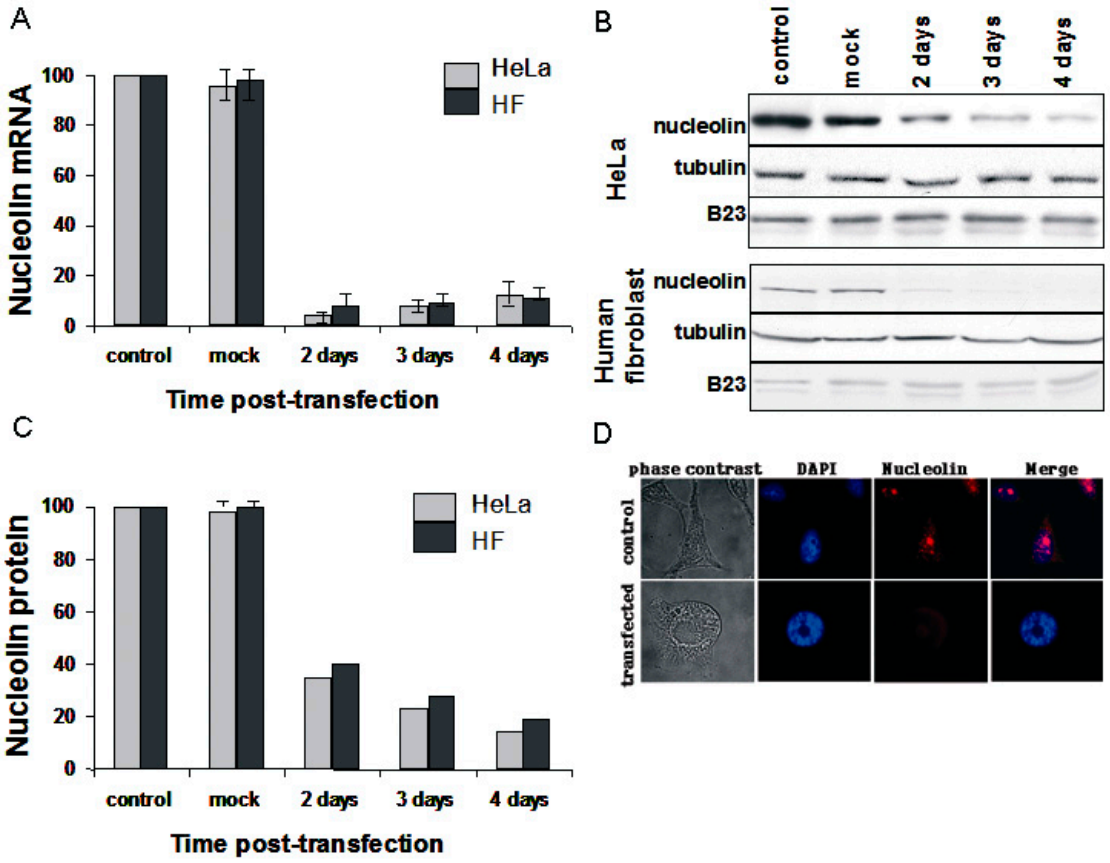

Figure 38 : *Inhibition de la nucléoline par ARN interférant.*

(A), RT-PCR quantitative. Au nombre de jours indiqués, les ARN totaux sont isolés. 100 ng d'ARN sont rétro-transcrits. Les ARN correspondants à la β-actine ainsi qu'au 18S sont analysés en parallèle et servent de référence. (B), au nombre de jours indiqués, les protéines totales sont extraites et analysées par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la nucléoline. La quantité de protéines est égale dans chaque puits et vérifiée par un anticorps dirigé contre l'α-tubuline. (C), quantification du Western blot. L'α-tubuline et la protéine B23 sont utilisées pour la normalisation. Les données correspondent à trois expériences différentes. (D), quatre jours après transfection, les cellules sont analysées par microscopie de fluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre la nucléoline. L'ADN est coloré au DAPI.

La nucléoline est une protéine abondante. Nous avons donc réalisé un Western blot des cellules transfectées afin de déterminer son niveau d'expression (**figure 38**B, C). Dans les cellules HeLa ainsi que dans les fibroblastes, la quantité de nucléoline commence à diminuer deux jours après transfection. Quatre à cinq jours après transfection, le niveau d'expression de

la nucléoline a diminué de 8 à 10 fois par rapport aux cellules contrôles. Le niveau d'expression de la protéine B23, une autre protéine abondante du nucléole, ne varie pas (**figure 38**B).

La diminution du niveau d'expression de la nucléoline dans les cellules transfectées est confirmée par immunofluorescence (**figure 38**D). La **figure 38** montre la localisation de la nucléoline dans des cellules contrôles et transfectées. Dans les cellules contrôles, la nucléoline est bien présente au niveau du nucléole. Le marquage est moins important dans les cellules transfectées, ce qui montre bien une diminution de l'expression de la nucléoline. Cette analyse par microscopie montre une importante modification morphologique des cellules. En effet, les cellules apparaissent plus rondes avec un seul nucléole volumineux.

B) La nucléoline est nécessaire à la structure du nucléole

Les changements morphologiques de la cellule ainsi que la présence de nucléole volumineux indiquent que la nucléoline pourrait avoir un rôle dans la structure du nucléole. En effet, la nucléoline est une des protéines majeures du nucléole. L'absence de nucléoline pourrait affecter l'agencement du nucléole. Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse par microscopie électronique du nucléole de cellules HeLa transfectées ou non par les siRNA a été effectuée. Nous avons utilisé deux contrôles. L'un correspond à des cellules qui n'ont pas été transfectées, l'autre correspond à des cellules transfectées par un siRNA n'ayant aucun effet sur la nucléoline. Cette analyse montre une profonde modification de la structure du nucléole (**figure 39**A, c et d).

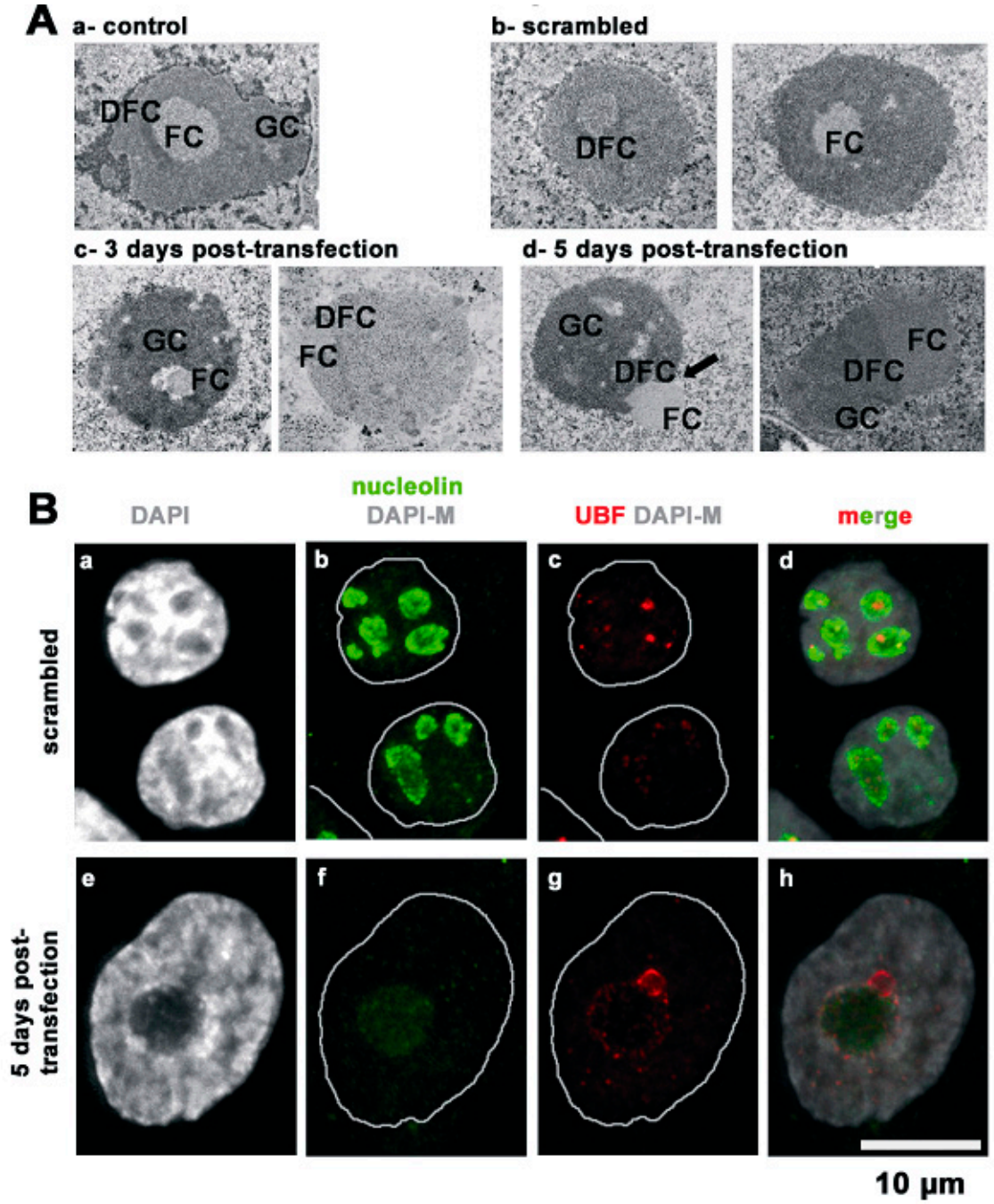

Figure 39 : *L'inhibition de la nucléoline entraîne une modification de la structure du nucléole.*

(A), analyse par microscopie électronique de la structure du nucléole : (a), cellules contrôles. (b), cellules transfectées par un siRNA sans effet. (c), structure du nucléole trois jours après transfection et (d), structure du nucléole cinq jours après transfection. FC : centre fibrillaire, DFC : composant fibrillaire dense, GC : composant granulaire (B), analyse par microscopie de fluorescence de la localisation de la nucléoline et du facteur UBF détectés à l'aide d'anticorps. L'ADN est coloré au DAPI.

Dans les cellules contrôles, les centres fibrillaires (FC) se situent au centre du nucléole. Ils sont entourés par les composants fibrillaires denses (DFC). Ces deux structures sont enveloppées par le composant granulaire (CG). En absence de nucléoline, les centres fibrillaires ainsi que les composants fibrillaires denses se situent à la périphérie du nucléole. Cette migration vers la périphérie est plus forte après cinq jours de transfection comparé à trois jours de transfection. Une ségrégation complète des centres granulaires peut être observée plusieurs jours après transfection. De plus, l'absence de nucléoline entraîne une augmentation significative du volume du nucléole. Les cellules transfectées par le siRNA sans aucun effet ont un nucléole dont la structure apparaît normale. C'est donc l'absence de nucléoline et non pas la transfection transitoire qui est à l'origine de la perturbation de la structure du nucléole.

L'organisation des composants du nucléole dans des cellules dépourvues de nucléoline a été confirmée par l'analyse par microscopie de fluorescence de la localisation de la nucléoline ainsi que d'UBF (**figure 39**B). Le facteur UBF est un facteur important pour la transcription Pol I. En effet, il est indispensable au recrutement de l'ARN Polymérase I sur le promoteur des gènes ribosomiques. Tout d'abord, les observations sur la taille et le nombre de nucléole en absence de nucléoline sont confirmées. L'absence de nucléoline entraîne une augmentation du volume nucléaire et dans la plupart des cellules, un seul nucléole volumineux est présent (**figure 39**B, e-h). Dans les cellules contrôles (cellules transfectées avec un siRNA n'ayant aucun effet), UBF est principalement présent dans les FC (**figure 39**B, c-d) alors que la nucléoline se situe dans les DFC et dans les GC. Dans les cellules dépourvues de nucléoline, le facteur UBF est toujours présent dans les FC trouvés à la périphérie des GC (**figure 39**B, g-h) alors que la nucléoline restante est localisée dans les DFC et dans les GC.

C) La nucléoline a un rôle important dans la synthèse du pré-ARNr

De nombreuses études ont montré qu'il existe une relation entre la structure du nucléole et sa fonction. En effet, en fonction de son activité biologique, le nombre ainsi que la taille des centres fibrillaires est variable. Le nucléole est une organelle dont la fonction principale est la biogenèse des ribosomes. Il se forme dans le noyau autour des gènes ribosomiques. La formation du nucléole nécessite la transcription de ces gènes. La nucléoline est impliquée dans toutes les étapes de synthèse des ARNr. Elle intervient dans la transcription et la maturation des ARNr ainsi que dans l'assemblage des particules

ribosomiques. La perturbation de la structure des nucléoles en absence de nucléoline est probablement liée à une modification de la synthèse du pré-ARNr. Afin de déterminer l'impact de l'absence de nucléoline sur la synthèse des ARNr, nous avons analysé par Northern blot et par RT-qPCR le taux du pré-ARNr 45S. Cette étude a été effectuée sur les cellules HeLa. Par cette approche expérimentale, nous avons détecté une diminution du taux de pré-ARNr 45S dans les cellules transfectées par le siRNA (**figure 40**).

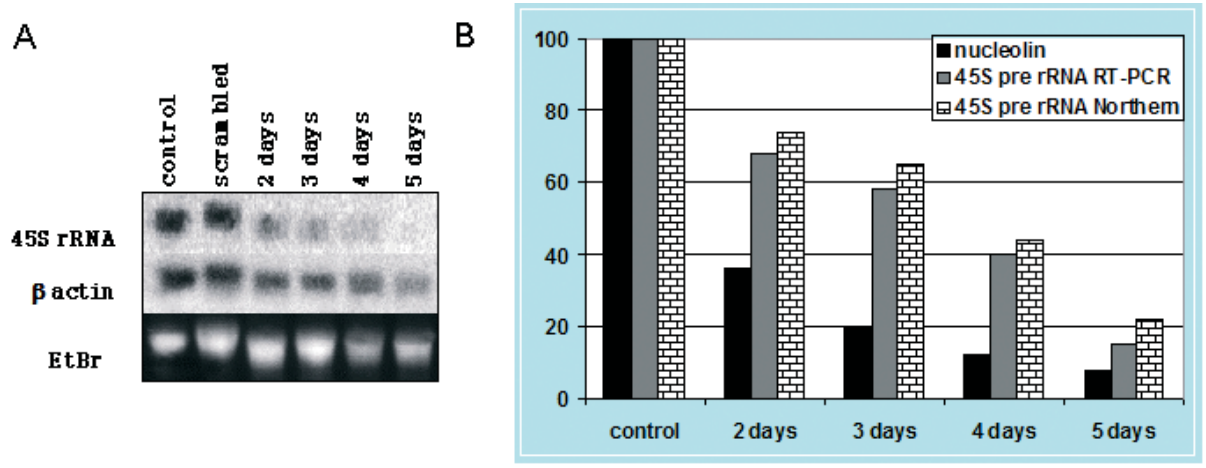

Figure 40 : *L'inhibition de la nucléoline entraîne une diminution de la synthèse du pré-ARNr 45S.*

(A), analyse par Northern blot de la quantité du pré-ARNr 45S. 5 µg d'ARN totaux sont déposés sur une membrane et hybridés avec une sonde complémentaire d'une séquence de 35 nucléotides localisés dans la partie 5' ETS. Cette séquence est située en amont du premier site de coupure du pré-ARNr humain. La normalisation a été effectuée par l'ARN messager de la β-actine. La coloration au bromure d'éthidium (EtBr) est également utilisée pour vérifier la quantité d'ARN déposée. (B), le taux de pré-ARNr a également été étudié par RT-PCR quantitative. Au nombre de jours indiqué, les ARN totaux sont isolés et 100 ng d'ARN sont rétro-transcrits. Les sondes utilisées pour le pré-ARNr 45S sont les mêmes que pour le Northern blot. La normalisation s'effectue à l'aide de la β-actine et du 18S. La quantification du Northern blot ainsi que la quantité de nucléoline sont également représentées.

La diminution du pré-ARNr commence dès le deuxième jour de transfection (**figure 40**) et est de plus en plus importante au fil des jours de transfection. Cette diminution est confirmée par les expériences de RT-PCR. Comme le montre la **figure 40**B, il y a une corrélation entre la diminution de la nucléoline et la diminution du taux de pré-ARNr.

L'absence de nucléoline entraîne une diminution du pré-ARNr de 5 à 8 fois par rapport à la quantité des cellules contrôles. L'effet de l'absence de nucléoline sur l'expression du pré-ARNr est donc très important.

D) L'absence de nucléoline provoque une perturbation du cycle cellulaire

Le nucléole n'est pas seulement associé à la biogenèse des ribosomes. Il est associé à d'autres fonctions comme la prolifération cellulaire. L'observation par microscopie optique des cellules HeLa et des fibroblastes humains transfectées montre clairement que le taux de prolifération des cellules est affecté. En effet, lorsque le même nombre de cellules (contrôles et transfectées) a été mise en culture, le comptage des cellules transfectées montre une diminution du nombre de ces cellules par rapport aux cellules contrôles (**figure 41**A). Les cellules HeLa transfectées semblent s'arrêter de se diviser dès que le niveau d'expression de la nucléoline diminue.

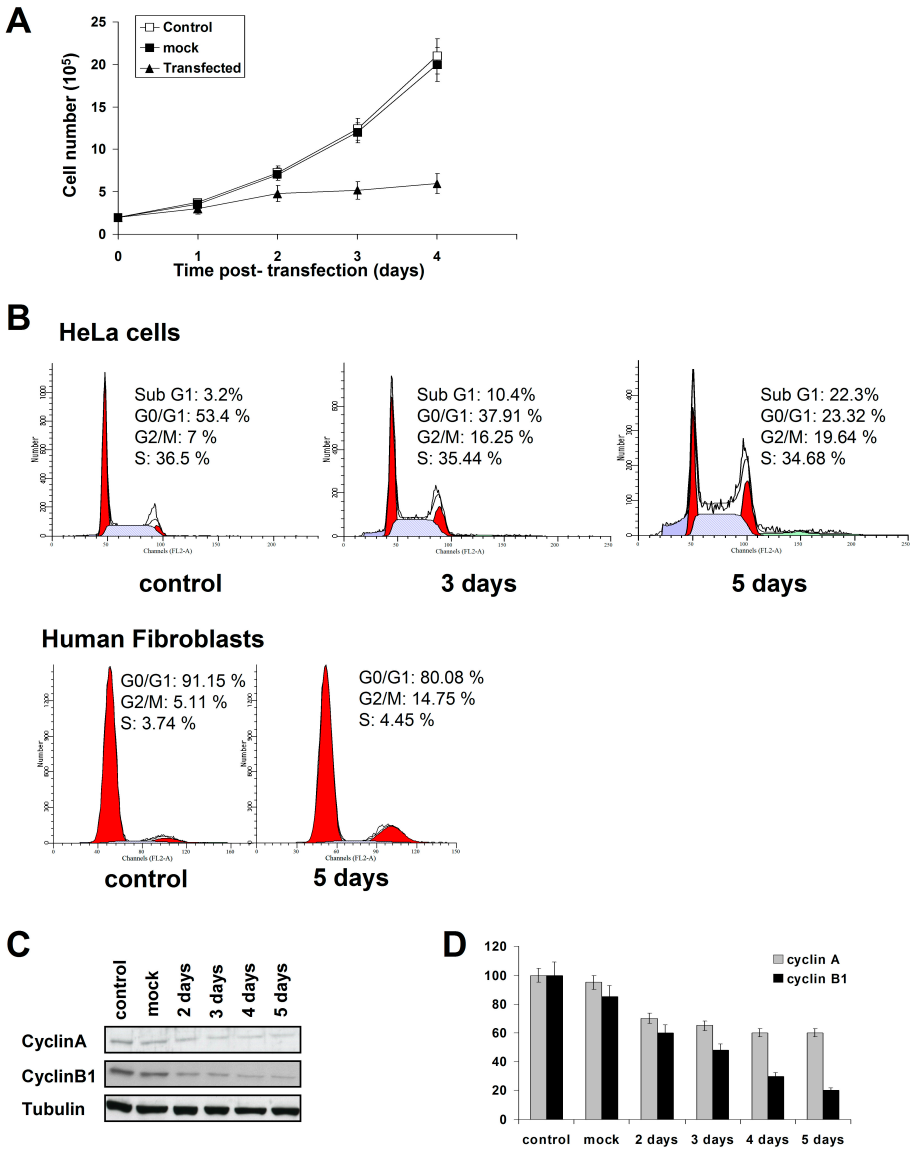

Figure 41 : *La nucléoline a un rôle dans la prolifération des cellules.*

(A), courbe de croissance des cellules HeLa après transfection avec le siRNA contre la nucléoline et le siRNA sans effet (Mock). Les cellules ont été comptées au nombre de jours après transfection indiqués. Des résultats similaires ont été obtenus pour 5 expériences différentes. (B), histogramme montrant les phases G0/G1 (grand pic) et G2/M (petit pic) en rouge et la phase S en gris. Les axes verticaux et horizontaux indiquent le nombre de cellules et le canal FL2A respectivement. Les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont été quantifiés à l'aide du logiciel Modfit™ LD. (C), analyse de l'expression des cyclines A et B1 par Western blot en utilisant un anticorps spécifique de chaque cycline. (D), quantification du Western blot par normalisation avec la tubuline.

Pour déterminer si la croissance des cellules est bloquée à un moment précis du cycle cellulaire, une analyse du cycle cellulaire des cellules HeLa et des fibroblastes humains a été effectué par cytométrie de flux (FACS) (**figure 41**B). Le cycle cellulaire se compose de quatre phases : la phase G1, S, G2, M (mitose). La cytométrie de flux est une technique permettant d'analyser le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Le graphique obtenu se divise en quatre parties (**figure 41**). Le plus grand pic représenté en rouge correspond aux cellules en phase G0/G1. Le plus petit pic en rouge représente les cellules en phase G2/M. Entre ces deux pics, est représenté en gris la phase S. Dans les deux types cellulaires, une importante diminution du nombre de cellules en phase G0/G1 est observée (de 53 % à 23 % pour les cellules HeLa et de 91 % à 80 % pour les fibroblastes). En revanche, le nombre de cellules en phase G2/M augmente de façon significative (de 7 % à 19 % pour les cellules HeLa et de 5 % à 14,7 % pour les fibroblastes). Le nombre de cellules en phase S n'est presque pas modifié (de 36,5 % à 34,7 % pour les cellules HeLa et de 3,7 % à 4,4 % pour les fibroblastes). Ces données suggèrent que le manque de nucléoline entraîne un arrêt des cellules en phase G2/M.

Le cycle cellulaire est régulé par des complexes constitués d'une cycline et d'une kinase. Chaque phase du cycle possède son complexe. Pour identifier les cibles qui peuvent être impliquées dans la perturbation du cycle cellulaire, nous avons analysé par Western blot le niveau d'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire, la cycline A et la cycline B1. La cycline A est impliquée dans la réplication de l'ADN (phase S) et dans le passage de la phase S en phase G2. La cycline B1 a un rôle dans l'entrée en mitose. L'analyse par Western blot indique que le taux d'expression de la cycline A dans des cellules transfectées diminue légèrement par rapport aux cellules contrôles (diminution de 1,5 fois) (**figure 41**C, D). En revanche, le niveau d'expression de la cycline B1 décroît de façon significative. L'arrêt du cycle s'accompagne donc d'une perturbation de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire.

E) L'absence de nucléoline provoque l'apoptose des cellules

Après 4 jours de transfection, les cellules commencent à mourir. La diminution du nombre de cellules est consécutive à une augmentation de la mort cellulaire. La mort des cellules peut être due à une nécrose ou à l'apoptose. L'observation des cellules par microscopie optique nous a orienté sur l'apoptose car de nombreuses cellules présentaient des signes de coupures de l'ADN en petits fragments. Pour tester la mort des cellules par

apoptose, nous avons utilisé la technique de "TUNNEL assay". Cette technique permet de détecter les cellules en apoptose. En effet, elle repose sur l'utilisation de l'UTP marqué à la fluorescéine et de la terminale transférase. Cette enzyme a la capacité d'ajouter l'UTP sur la partie 3' des fragments d'ADN. La détection de l'UTP marqué indique donc s'il y a apoptose ou non des cellules. La **figure 42**A et B montre que 5 jours après transfection, 25 % des cellules sont apoptotiques.

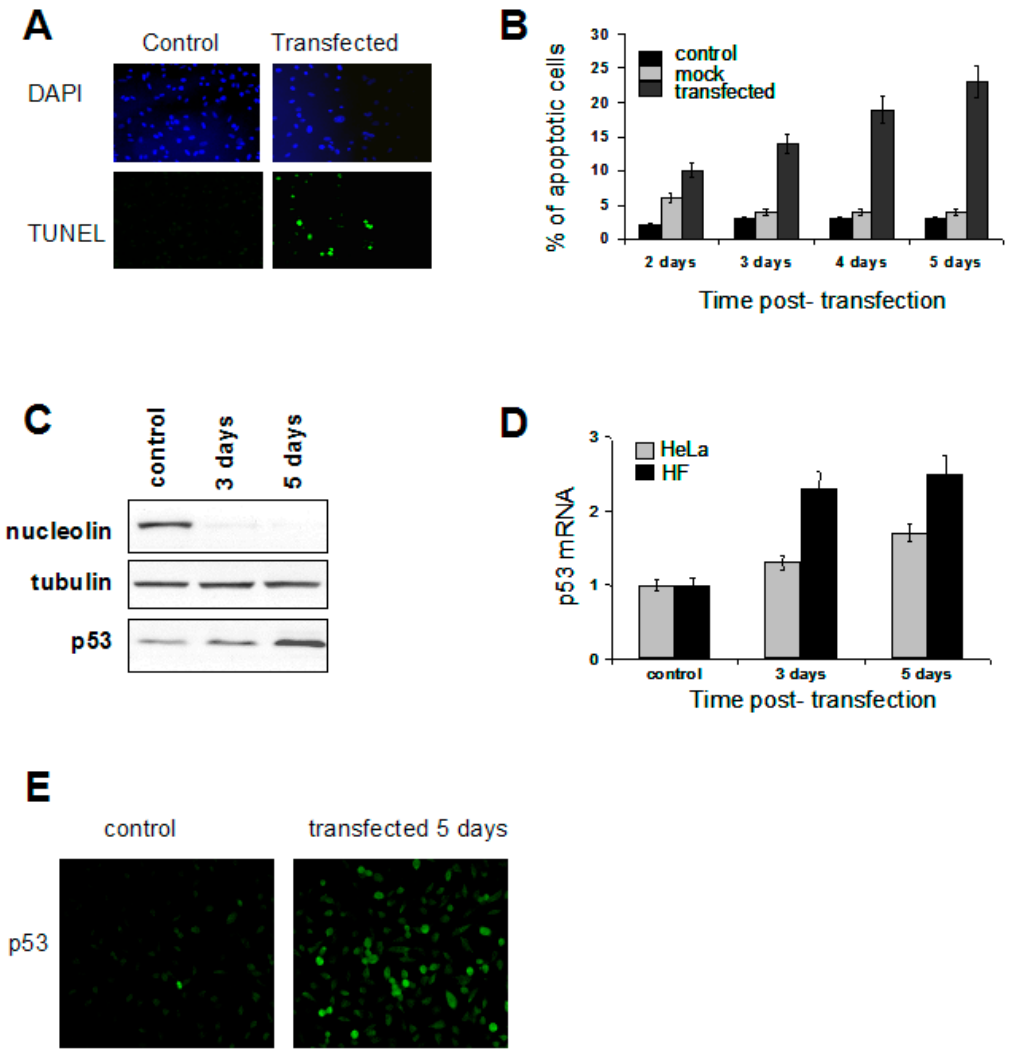

Figure 42 : *L'absence de nucléoline provoque l'induction de l'apoptose.*

(A), expérience de "TUNNEL assay". Variation du nombre de cellules apoptotiques entre cellules contrôles et cellules dépourvues de nucléoline. Cette expérience a été réalisée 4 jours après transfection. (B), l'expérience de "TUNNEL assay" montre une augmentation de l'apoptose des cellules transfectées par le siRNA contre la nucléoline par rapport aux cellules contrôles et aux cellules transfectées par un siRNA sans effet. Le nombre de cellules apoptotiques a été déterminé par comptage d'au moins 400 cellules de deux expériences indépendantes. (C), analyse par Western blot de l'expression de p53 et de la nucléoline à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque protéine. L'expérience a été réalisée 4 jours après transfection. La normalisation est effectuée avec la tubuline. (D), RT-PCR quantitative. Des sondes spécifiques de l'ARN messager de p53 ont été utilisées. Le taux d'ARN messager de p53 a été calculé en fonction de l'ARN messager de l'actine utilisé comme référence. (E), analyse après 4 jours de transfection par immunofluorescence de l'expression de p53 dans des cellules contrôles et dans des cellules transfectées par le siRNA contre la nucléoline.

Dans la littérature, il a été montré que le blocage de la prolifération des cellules et l'induction de l'apoptose sont dépendants de l'activation de p53. Nous avons donc analysé l'expression de la protéine p53 par Western blot et par immunofluorescence (**figure 42**C et E). L'expérience montre que le niveau d'expression de p53 est plus élevé dans les cellules dépourvues de nucléoline. Ce résultat est confirmé par l'analyse de la quantité d'ARN messager de p53 qui augmente significativement dans les cellules transfectées par le siRNA par rapport aux cellules contrôles (**figure 42**D).

En utilisant la technique d'ARN interférant, nous avons diminué de façon significative la quantité de nucléoline dans des cellules HeLa et dans des fibroblastes humains. L'inhibition de la nucléoline entraîne plusieurs effets : *(i)* une perturbation de la structure du nucléole, *(ii)* une diminution de l'expression du pré-ARNr, *(iii)* un arrêt du cycle cellulaire en mitose accompagné d'une perturbation de l'expression de la cycline B1 et *(iv)* une mort cellulaire par apoptose et une stabilisation de p53.

Chapitre 3 : DISCUSSION

La structure du nucléole est liée à la transcription des gènes ribosomiques. L'inhibition de la transcription est associée à une déstructuration du nucléole (Yuan *et al.*, 2005). La régulation de la transcription des gènes ribosomiques est donc un phénomène important. L'expression des gènes est régulée par l'intermédiaire de la chromatine. La chromatine est une structure dynamique qui peut être modulée par différents mécanismes. Les deux premiers mécanismes font appel aux facteurs de remodelage et aux modifications post-traductionnelles des histones conventionnelles. Le dernier mécanisme se base sur le remplacement des histones conventionnelles par des histones variants.

A) MacroH2A : régulateur de l'expression des gènes

Les modifications post-traductionnelles des histones et les variants d'histone sont connues pour être importants dans la définition des états chromatiniens. Par exemple, l'acétylation des histones est associée à un état actif de la transcription alors que la méthylation est associée aussi bien à une activation qu'à une répression. Le variant macroH2A est impliqué dans la répression de l'initiation de la transcription. MacroH2A pourrait-il agir comme un régulateur de l'expression des gènes ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé le système cellulaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio L.)*. Ce poisson doit s'acclimater aux différentes conditions de température (hiver et été). Au niveau cellulaire, l'acclimatation à la saison d'hiver se traduit par une déstructuration du nucléole et une diminution de l'expression des gènes ribosomiques (Vera *et al.*, 1993). Nous avons montré que, comme pour la nucléoline, l'expression de macroH2A diffère en fonction des conditions climatiques chez la carpe commune. Durant les saisons froides, l'expression de macroH2A est augmentée et les îlots CpG présents au niveau des promoteurs des gènes ribosomiques sont hyperméthylés. Nous avons donc en parallèle une augmentation de l'expression de la nucléoline et de macroH2A pendant les saisons d'hiver. Ces résultats ainsi que le fait que macroH2A soit présent dans le nucléole (Andersen *et al.*, 2002) suggèrent que macroH2A ait la capacité de réguler l'expression des gènes ribosomiques.

En perspective de ce travail, il serait intéressant de montrer plus précisément l'implication de macroH2A dans la régulation des gènes ribosomiques. Il serait intéressant d'étudier l'expression de macroH2A au niveau nucléolaire. Il est envisageable que macroH2A soit plus présent dans les nucléoles dans les conditions hivernales que dans les conditions estivales.

Peu de données existent sur le fonctionnement de macroH2A en temps que répresseur de la transcription. MacroH2A est-il spécifique de certains gènes ? Est-il présent dans des domaines particuliers comme les promoteurs ? Agit-il seul ou accompagné d'autres modifications d'histones ?

1) Présence de macroH2A dans des zones précises de la chromatine

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons utilisé la technique d'étirement de la chromatine développée par Sullivan *et al* (Sullivan *et al.*, 2004). Nous avons choisi cette méthode car la fibre observée est une fibre unique issue d'une cellule alors que des techniques complémentaires comme l'immunoprécipitation de la chromatine s'effectue sur une population de cellules. Nous avons étudié la répartition de macroH2A sur une fibre de chromatine étirée. Nous avons également observé H2A-Bbd car il a un effet inverse de macroH2A. Nous avons visualisé dans un premier temps de la chromatine peignée sur une surface de verre. Une fois la technique d'étirement mise au point, nous avons observé la distribution des variants sur une fibre de chromatine étirée. Pour corréler le positionnement au sein de la chromatine, nous avons utilisé deux marqueurs : la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 qui est marqueur de l'hétérochromatine et l'acétylation de la lysine 12 de H4 qui marque l'activité transcriptionnelle.

L'histone conventionnelle H2A fusionnée à la GFP a une répartition homogène. Elle est présente tout au long de la fibre de chromatine. Le fait que l'histone H2A-GFP ait une distribution homogène montre que les histones fusionnées à la GFP s'incorporent dans la chromatine. Contrairement à H2A-GFP, les variants d'histone présentent un marquage ponctuel le long de la fibre de chromatine. MacroH2A, H2A-Bbd ainsi que la 3MeK93 ont une distribution discontinue. En revanche, l'AcK12H4 se présente sous forme de points très proches les uns des autres. Il semblerait que l'acétylation soit une modification d'histones présente en grande quantité dans la chromatine. La répartition montre qu'il y a une alternance entre la présence et l'absence des variants et des modifications. Les variants d'histones sont

donc concentrées dans des zones précises du génome. Cette répartition discontinue, sous forme de points, a déjà été observée pour un autre variant par Sullivan *et al.* (Sullivan *et al.*, 2004). Les auteurs étudient un variant de l'histone H3, l'histone CENP-A présente au niveau des centromères. Ils montrent que la protéine CENP-A n'occupe pas l'ensemble du centromère mais des zones ponctuelles très similaires à celles que nous observons (Sullivan *et al.*, 2004). Ces points sont des « clusters » de variants.

L'autocorrélation a permis de montrer que macroH2A et la 3MeK9H3 sont agencés périodiquement. En revanche H2A-Bbd et l'AcK12H4 ne le sont pas. Leur distribution se fait de façon apparemment aléatoire au sein de la chromatine. Ce résultat suggère que macroH2A et la 3MeK9H3 participent à une organisation ordonnée de la chromatine.

Le fait que nous ayons une distribution discontinue, c'est-à-dire une alternance entre la présence et l'absence des modifications ou des variants suggèrent que les zones spécifiques de la chromatine sont organisées soit sous forme de solénoïdes, soit sous forme de boucle (Blower *et al.*, 2002). Ceci est en accord avec un modèle proposant la formation de boucle de la chromatine. En effet, il a été proposé que les ARN Polymérases ne soient pas indépendantes mais regroupées dans des usines (factories) (Cook, 1999) et soient à l'origine des nœuds qui participent à la formation des boucles de chromatine (Bartlett *et al.*, 2006). L'alternance entre l'absence et la présence des histones étudiées ici suggère un repliement de la chromatine au niveau de ces clusters de variants.

2) Influence sur la transcription

MacroH2A a un rôle dans la régulation des gènes mais agit-il seul ou associé à des modifications d'histones ? Pour répondre à cette question, nous avons visualisé sur une même fibre les variants avec les modifications d'histones. Nous avons montré que macroH2A colocalise avec la 3MeK9H3. Cette modification est un marqueur de l'hétérochromatine. Ce résultat est en accord avec la littérature. MacroH2A a été montré comme un inhibiteur de la transcription. MacroH2A ainsi que la 3MeK9H3 sont tous les deux associés à des régions d'hétérochromatine comme le chromosome X inactif (Boggs *et al.*, 2002; Costanzi *et al.*, 2000). Cependant, il a été montré que macroH2A est présent dans le promoteur de gènes actifs. En effet, Agelopoulos *et al.* montrent que macroH2A est recruté par l'hétérodimère ATF2/JunD au sein du promoteur du gène de l'interleukine 8 entraînant ainsi une répression de la transcription (Agelopoulos *et al.*, 2006). De même que pour macroH2A, la 3MeK9H3 peut également être présente dans des gènes actifs (Brinkman *et al.*, 2006; Vakoc *et al.*,

2005). Nous pouvons nous demander quelle est la raison de la présence de ce variant et de cette modification dans des gènes actifs puisqu'ils semblent être associés à une répression de la transcription. Il est possible que la quantité d'histones présentes soit un facteur important. Une quantité faible d'histone n'aura pas le même effet sur l'expression des gènes qu'une forte quantité.

Etant donné que macroH2A et la 3MeK9H3 sont tous les deux associés à une répression de la transcription, il serait intéressant de se demander la raison de cette colocalisation. Pourquoi donc utiliser deux marqueurs de la répression si un seul suffit ? Il a été montré que macroH2A inhibe l'acétylation des histones et l'initiation de la transcription (Doyen *et al.*, 2006a). La 3MeK9H3 est associée au recrutement de la protéine HP1 (Lachner *et al.*, 2001). Il est possible que chaque histone ait un rôle à jouer dans la répression ou que la répression doit être suffisamment forte pour justifier l'utilisation de deux marqueurs de la répression. MacroH2A aurait pour rôle d'initier la répression de la transcription et la 3MeK9H3 aurait un rôle de maintien de cette répression.

Nous montrons également que H2A-Bbd-GFP colocalise avec l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4. Ce résultat est en accord avec Chadwick *et al.* qui ont montrés que H2A-Bbd colocalise avec l'acétylation dans des cellules en interphase (Chadwick *et al.*, 2001b). Cependant, cette colocalisation n'est pas totale. En effet, l'AcK12H4 ne colocalise pas toujours avec H2A-Bbd-GFP. Ceci peut être dû au fait que nous utilisons la protéine GFP pour détecter H2A-Bbd. Cependant, il est également possible que l'acétylation soit une modification fréquente dans la chromatine alors que H2A-Bbd serait plus restreint. H2A-Bbd ne colocalise pas avec la 3MeK9H3. Le fait que H2A-Bbd ne colocalise pas avec cette modification nous indique qu'elles sont mutuellement exclusives. Ce résultats est en accord avec le fait que H2A-Bbd est un activateur de la transcription (Doyen *et al.*, 2006b).

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses et ce paragraphe ne se veut en aucun cas exhaustif. Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer de quelle fibre il s'agit. Nous pourrions coupler la technique d'étirement de la chromatine et la technique d'AFM. L'AFM consiste à balayer une surface à l'aide d'une pointe fine nanométrique et de mesurer la déflection de cette pointe. L'utilisation de cette technique permettrait d'obtenir des informations plus précises sur la taille de la fibre ou reconnaître des modifications d'histones à une résolution d'un nucléosome en utilisant des anticorps couplés à la pointe (Stroh *et al.*). La répartition de ces deux variants a été étudiée dans tout le génome. Il serait intéressant de

pouvoir se repérer dans le génome en utilisant la technique d'hybridation *in situ* (FISH) et d'étudier la répartition des variants et des modifications pour un gène donné.

La chromatine joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. L'un des mécanismes impliqué dans cette régulation est le remplacement des histones canoniques par des variants. Toutefois, la régulation des gènes ribosomiques est également sous le contrôle de protéines nucléolaires comme la nucléoline.

B) Rôle de la nucléoline dans la régulation de la transcription des gènes ribosomiques

La nucléoline est une protéine chaperonne d'histone qui intervient dans la transcription et la maturation de l'ARN pré-ribosomique. Afin de mieux comprendre le rôle exact de cette protéine dans la prolifération des cellules et dans la structure du nucléole, nous avons diminué la quantité de nucléoline par l'utilisation de la technique d'ARN interférant. Nous observons que l'absence de nucléoline entraîne : *(i)* une modification de la structure du nucléole, *(ii)* une diminution de la quantité de l'ARN pré-ribosomique, *(iii)* un arrêt du cycle cellulaire en mitose et *(iv)* une accumulation de p53.

1) La nucléoline est indispensable à la vie cellulaire

L'absence de nucléoline a un effet drastique sur la survie des cellules. En effet, les cellules dépourvues de nucléoline ne se divisent plus et meurent. Ces données suggèrent que la nucléoline est indispensable au fonctionnement de la cellule. De plus, l'absence de nucléoline ne modifie pas le niveau d'expression de la protéine B23. B23 est une protéine abondante du nucléole qui présente des similitudes dans sa fonction comparée à celle de la nucléoline. C'est également une histone chaperonne. Elle joue un rôle important dans la biogenèse des ribosomes. En effet, elle participe à la maturation du pré-ARNr.

2) Perturbation de la transcription et de la structure du nucléole

La diminution de la quantité du pré-ARNr pourrait s'expliquer par *(i)* une baisse de l'activité de l'ARN Polymérase I ou *(ii)* une dégradation rapide du pré-ARNr au cours de la phase de maturation de l'ARN, la nucléoline étant particulièrement importante au cours de

cette phase. Nous avons montré que la structure du nucléole est modifiée. En effet, les centres fibrillaires, normalement situés au centre du nucléole, se retrouvent en périphérie, ce qui correspond à une inhibition de l'activité de l'ARN Polymérase I par l'actinomycine D (Schofer *et al.*, 1996). La diminution de la synthèse de l'ARN pré-ribosomique dans des cellules dépourvues de nucléoline est donc probablement due à une inhibition de l'activité de l'ARN Polymérase I. Cependant, nous ne savons pas dans quel ordre s'effectue l'inhibition. En effet, il est connu que la structure du nucléole est liée à la transcription Pol I (Melese *et al.*, 1995). L'absence de nucléoline provoque-t-elle une baisse de la transcription Pol I ce qui engendre une déstructuration du nucléole ou est ce l'inverse ? Dans le cas inverse, la nucléoline serait nécessaire à la structure du nucléole. La modification de la structure du nucléole serait à l'origine de l'inhibition de la transcription Pol I.

Le blocage de l'activité de l'ARN Polymérase I pourrait avoir deux origines. Soit, il est direct *i.e.* la polymérase serait affectée, soit il est indirect, *i.e.* comme par exemple une modification de la composition/structure de la chromatine. C'est cette seconde hypothèse qui apparaît être la plus plausible car nous savons que la nucléoline est une protéine chaperonne présentant une activité FACT (Angelov *et al.*, 2006).

3) La nucléoline et la réponse à un stress

L'analyse par cytométrie de flux montre une perturbation du cycle cellulaire qui se traduit par une accumulation des cellules en mitose. L'accumulation en G2/M pourrait traduire une fonction de la nucléoline dans la régulation ou la progression du cycle cellulaire. Pour identifier les cibles qui pourraient être à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire, nous avons mesuré le taux d'expression des cyclines A et B1. Il apparaît que l'absence de nucléoline provoque une diminution de l'expression de la cycline B1 alors que le niveau d'expression de la cycline A reste inchangé. La cycline B1 est indispensable pour la mitose. L'accumulation des cellules en mitose est probablement due à la diminution de la cycline B1. Ces donnés montrent un lien entre la nucléoline et la progression du cycle cellulaire et montrent également que la dérégulation de la transcription Pol I a un effet sur les régulateurs du cycle cellulaire.

Des expériences de "TUNNEL assay" montrent que 25 % des cellules sont apoptotiques 5 jours après transfection. L'absence de nucléoline provoque donc l'apoptose des cellules. La protéine p53 est le premier médiateur de la réponse au stress. Rubbi *et al.* montrent que la perturbation du nucléole provoque une stabilisation de p53 et non pas

l'inverse (Rubbi *et al.*, 2003). Dans les cellules dépourvues de nucléoline, nous observons une augmentation de p53. Ces résultats montrent la relation qui existe entre la structure du nucléole, la prolifération des cellules et le niveau de p53.

Des résultats similaires ont été obtenus par l'inhibition de facteurs ayant un rôle important dans la transcription Pol I. L'inhibition du facteur UBF, facteur important dans la transcription Pol I, entraîne une déstructuration du nucléole et une stabilisation de p53 (Rubbi *et al.*, 2003). L'enlèvement de TIF-IA provoque une déstructuration du nucléole, un arrêt du cycle cellulaire et une accumulation de p53 (Yuan *et al.*, 2005). Le facteur TIF-IA a un rôle essentiel dans le recrutement de pol I sur le promoteur des gènes ribosomiques. L'arrêt de la transcription Pol I par l'actinomycine D ou par l'inhibition de UBF ou de TIF-IA ont les mêmes conséquences que l'inhibition de la nucléoline c'est-à-dire une déstructuration du nucléole, un arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. De plus, il a été montré qu'une diminution de l'activité de Bop 1, protéine nucléolaire également nécessaire à la maturation du pré-ARNr, provoque un stress nucléolaire et mène à un arrêt du cycle par l'intermédiaire de p53 (Pestov *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que l'absence de nucléoline est la cause d'un stress nucléolaire. Ce stress serait à l'origine de l'accumulation de p53 et du déclenchement de la mort cellulaire par apoptose.

En conclusion, la nucléoline a un rôle essentiel dans la structure du nucléole et dans la prolifération des cellules. L'absence de nucléoline est à l'origine d'une diminution de la synthèse de l'ARN pré-ribosomique accompagnée d'une perturbation de la structure du nucléole. Le changement de structure de nucléole se traduit par l'accumulation de p53 qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose.

C) Mécanisme de régulation des gènes ribosomiques

La nucléoline possède une activité FACT, c'est-à-dire qu'elle est capable de déstabiliser le nucléosome et de permettre le passage de la Pol II. Nous savons que la nucléoline est une protéine chaperonne d'histone. Elle est capable en présence de SWI/SNF de remodeler les nucléosomes contenant macroH2A mais pas ceux contenant H2ABbd. L'existence de protéine chaperonne d'histone a déjà été découverte pour certains variants. En effet, il a été montré que le complexe SWR1 est capable de remplacer un dimère H2A-H2B par un dimère H2A.Z-H2B dans un nucléosome (Mizuguchi *et al.*, 2004). Chez la drosophile, le variant H2A.X phosphorylé peut être remplacé par ce même variant mais non phosphorylé

par le complexe TIP 60 (Kusch *et al.*, 2004). A partir de ces donnés, nous pouvons formuler l'hypothèse que la nucléoline régule l'activité des gènes ribosomiques en agissant sur la chromatine. Il est possible que la nucléoline soit capable de remplacer un dimère H2A-H2B par un dimère macroH2A-H2B. La nucléoline interviendrait dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques conjointement avec le variant macroH2A. Toutefois, il a été montré que les gènes ribosomiques sont régulés par l'intermédiaire d'un ARN issu de la transcription des séquences intergéniques par le promoteur distal (Mayer *et al.*, 2006). Ces ARN sont nécessaires à l'établissement et au maintien de l'hétérochromatine sur le promoteur de certains gènes ribosomiques. En effet, ils interagissent avec le complexe NoRC. L'inhibition de cette interaction empêche la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et le recrutement de HP1. Aujourd'hui, nous ne connaissons pas le mode de régulation de la transcription de ces ARN. Il est possible que la nucléoline ainsi que macroH2A soient impliqués.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de vérifier si l'effet de la nucléoline se situe au niveau de la chromatine et s'il existe un lien entre la nucléoline et macroH2A dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au mode de régulation de l'expression des gènes ribosomiques. Chez la carpe, l'adaptation à des températures hivernales s'accompagne d'une perturbation de la structure du nucléole et d'une diminution de l'expression des gènes ribosomiques. Nous avons montré que cette diminution est corrélée à une augmentation du niveau d'expression du variant macroH2A et de la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 ainsi qu'à une hyperméthylation des îlots CpG situés dans le promoteur des gènes ribosomiques.

La technique d'étirement de la chromatine a permis d'étudier la répartition de macroH2A et de H2A-Bbd dans la chromatine. Nous avons montré que la distribution de ces deux variants ainsi que celle de deux modifications d'histone (3MeK9H3 et AcK12H4) le long de la chromatine étirée n'est pas aléatoire. En effet, les variants ainsi que les modifications d'histone se présentent sous forme de points discontinus localisés dans des zones précises de la chromatine. L'évaluation de la distance entre deux points successifs montre que macroH2A et la 3MeK9H3 ont une périodicité c'est-à-dire qu'elles apparaissent de façon régulière sur la chromatine. En revanche, H2A-Bbd et l'AcK12H4 ne présentent pas de périodicité. Nous avons également montré que macroH2A colocalise avec la 3MeK9H3, ce qui n'est pas le cas pour H2A-Bbd.

Les variants d'histone ne sont pas les seules protéines intervenant dans la régulation de l'expression des gènes. D'autres protéines sont également impliquées dans ce processus. C'est le cas de la nucléoline. L'inhibition par RNAi de la nucléoline montre une diminution de l'expression de l'ARN pré-ribosomique accompagnée par une perturbation de la structure du nucléole. L'absence de nucléoline provoque un stress cellulaire qui se traduit par l'accumulation de la protéine p53 et d'un arrêt du cycle cellulaire.

L'ensemble de ces expériences nous a permis de mettre en évidence d'importantes caractéristiques de la nucléoline et de macroH2A dans la régulation de l'expression des gènes et notamment dans le cas des gènes ribosomiques.

Chapitre 4 : MATERIELS ET METHODES

I) Visualisation des variants et des modifications d'histones sur une fibre de chromatine étirée

A) Matériels utilisés

1) Cellules

Pour les expériences d'étirement de la chromatine, nous avons utilisé les cellules HeLa. Ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (FCS, Life Technologies, Inc.), 1% d'acides aminés non essentiels et 0,5 % d'un mélange pénicilline/streptomycine (Life Technologie, Inc.). Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C avec 5 % CO_2.

2) Plasmides

Trois plasmides ont été utilisés dans ces expériences. Ces plasmides codent pour H2A-GFP, macroH2A-GFP et H2A-Bbd-GFP. Dans les trois cas le plasmide utilisé est le pEGFP-C1. L'histone est positionnée en aval de la partie C-terminale de la protéine EGFP.

3) Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 (06-761, Upstate) et la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (ab 8898, Abcam) pour les modifications. Tous les anticorps sont produits chez le lapin et sont dilués 200 fois. L'anticorps secondaire utilisé (T6778, Sigma) est couplé au TRITC (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate) et est dilué 400 fois.

B) Transfection des cellules

Les cellules sont placées dans des boites 6 puits (Coring incorporated) à une concentration de $2x10^5$ cellules par puits 24 heures avant transfection. Les cellules sont

transfectées à l'aide de la lipofectamine 2000 (11668-019, invitrogen). Les plasmides (concentration finale de 2,5 $\mu g.ml^{-1}$) ainsi que la lipofectamine (concentration finale de 6 $ng.ml^{-1}$) sont dilués séparément dans un milieu minimum, le MEM (Minimum Eagle Medium) et incubés 5 minutes à température ambiante. Le mélange lipofectamine/plasmide est incubé 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont cultivées pendant 4 heures dans le milieu MEM en présence des plasmides et de la lipofectamine. Au bout de 4 heures, le milieu est remplacé par du milieu complet.

C) Etirement de la chromatine

L'expérience d'étirement de la chromatine est réalisée 24 à 48 heures après transfection.

1) Traitement des surfaces par la polylysine

Nous utilisons des lames de verre de dimension 75x22 mm. Les lames sont dans un premier temps nettoyées pendant 24 heures sous agitation avec un détergent, (décon) dilué à 4%. Les lames sont rincées à l'eau distillée puis à l'eau ultra pure avant d'être séchées par de l'azote gazeux. Dans un second temps, les lames sont recouvertes de polylysine à une concentration de 0,1 $mg.ml^{-1}$ pendant 20 minutes puis rincées à l'eau distillée. Les lames sont stockées sous une hotte à flux laminaire pour les protéger de la poussière.

2) Récupération des cellules et fixation sur une lame de verre

Les cellules sont tout d'abord détachées de la surface par trypsinisation. Elles sont ensuite re-suspendues dans 75 mM KCl à une concentration de $2x10^5$ cellules par ml. 200 µl de cellules (environ $4x10^4$ cellules) sont projetés sur les lames à l'aide d'une cytocentrifugeuse (800 rpm, 4 minutes). Les cellules sont étalées sur un disque d'environ 0,5 cm de diamètre.

3) Obtention de la chromatine étirée

Les lames où se situent les cellules sont incubées 15 minutes dans un tampon de lyse (500 mM urée, 500 mM NaCl, 0,5 % Triton X100, PBS 1X), puis retirées lentement du

tampon. Cette étape permet l'accrochage et le peignage de la chromatine sur la surface traitée (**figure 43**). La lame est ensuite incubée 10 minutes dans un tampon de fixation (4 % de formaldéhyde, PBS 1X) puis 15 minutes dans un tampon de blocage (1% de BSA, PBS 1X).

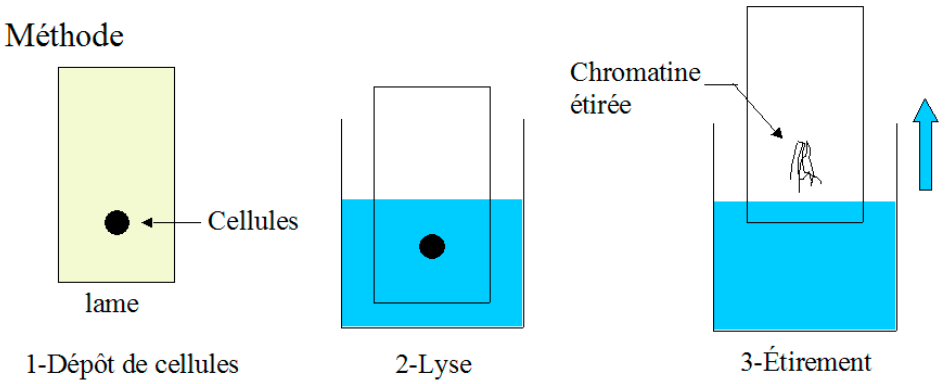

Figure 43 : *Principe de l'étirement de la chromatine.*
Les cellules sont placées sur la lame par la cytocentrifugeuse (1). La lame est ensuite plongée dans une solution de lyse (2). Les cellules sont ainsi détruites. La lame est retirée du liquide ce qui entraîne le peignage de la chromatine sur toute sa longueur (3).

4) Incubation des anticorps

Les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4°C dans une chambre humide pour ne pas que la lame sèche. L'anticorps secondaire est incubé à température ambiante pendant une heure. Après chaque anticorps, les lames sont rincées 3 fois 5 minutes dans un tampon de lavage (0,05 % Tween 20, PBS 1X). Le DAPI (Di-Aminido-Phenyl-lndol) est utilisé à une concentration de 250 $ng.ml^{-1}$ pour colorer la chromatine. Les lames où sont placées les cellules sont recouvertes d'un milieu de montage lui-même recouvert d'une lamelle. Le milieu de montage est une résine antifade (P-7481, Invitrogen-Molecular Probes).

5) Acquisition des images

Les images sont acquises séquentiellement. L'observation de la chromatine étirée s'effectue à l'aide d'un microscope inversé (Leica). Un jeu de filtre permet d'acquérir dans le même champ différents fluorophores (**tableau 2**).

Fluorophore	Filtre (excitation, émission)	Acquisition
DAPI	A (360BP40, 470BP40)	10 ms
GFP	L5 (480BP40, 527BP30)	200 ms
TRITC	N2.1 (537.5BP45, 590LP)	1s

Tableau 2 : *Fluorophore, filtre et temps d'acquisition utilisés pour les expériences d'étirement de la chromatine.*

L'acquisition des images est faite par une caméra CCD (Hamamatsu). Cette caméra est refroidie à –30°C pour une meilleure qualité des images.

II) Inhibition de l'expression de la nucléoline par ARN interférant

A) Matériels utilisés

1) Cellules

Dans le cas des expériences d'ARN interférant, les cellules HeLa et les fibroblastes humains ont été choisis. Les fibroblastes humains sont cultivés dans les mêmes conditions et dans le même milieu que les cellules HeLa mais supplémenté avec 15 % de sérum de veau fœtal.

2) ARN interférants

Deux siRNA spécifiques de la nucléoline humaine ont été déterminés et synthétisés chimiquement par Dharmacon. Chaque siRNA cible une partie de l'ARN messager de la nucléoline. Le **tableau 3** présente les caractéristiques des deux siRNA utilisés.

siRNA	Séquence	Domaine de la protéine
1	5'-P.UCCAAGGUAACUUUAUUUCUU	RBD 4
2	5'-P.UUCUUUGACAGGCUCUUCCUU	Région acide et NLS

Tableau 3 : *Caractéristique des deux siRNA utilisés.*

3) Anticorps

Pour les expériences de Western blot et d'immunofluorescence, différents anticorps ont été utilisés. Le **tableau 4** présente les différentes caractéristiques de ces anticorps.

Anticorps	Référence, société	Espèce	Dilution
nucléoline	A-134	lapin	1 : 1000
tubuline	T9026, sigma	souris	1 : 5000
B23		lapin	1 : 3000
p53	FL-393, Santa Cruz	lapin	1 : 250
cycline A	H-432, Santa Cruz	lapin	1 : 250
Cycline B1	GNS1, Abcam	souris	1 : 250
UBF		Humain	1 : 1000

Tableau 4 : *Anticorps utilisés pour les western blot et l'immunofluorescence. Caractéristiques des anticorps utilisés pour les expériences d'ARN interférent. L'anticorps polyclonal anti-B23 a été donné par Dr M. Olsson, l'anticorps UBF par K. Sullivan.*

B) Transfection des cellules

Les cellules sont placées dans des boites 6 puits à une concentration de $1x10^5$ cellules par puits 24 heures avant transfection. Les cellules sont transfectées avec un mélange des deux siRNA à une concentration finale de 100 nM à l'aide du réactif Dharmafect 1 de Dharmacon (Perbio Science France). Pour cela, les siRNA et le réactif sont incubés séparément 5 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite mélangés et incubés à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être mis en présence des cellules.

C) Western blot

Les cellules sont récupérées et lysées (50 mM Tris-HCl pH7.5 , 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % de déoxycholate de sodium, 0,1 % de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS)). $5x10^4$ ou $2x10^5$ cellules par puits sont déposées dans un gel SDS-polyacrylamide 10 % puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protan, Schleicher & Schuell, Allemagne). La membrane est saturée avec 5% de lait, du PBS 1X et 0,1 % de Tween 20 avant d'être incubée avec les anticorps primaires à température ambiante. La membrane est lavée une première fois avec un tampon contenant du NaCl 0,5M, du PBS 1X et 0,5 % de Tween 20 et plusieurs fois ensuite avec du PBS 1X et 0,1 % de Tween 20. Après les différents lavages, la membrane est incubée à température ambiante avec deux anticorps secondaires, un anticorps anti-lapin (Sigma) et un anticorps anti-souris (NA931, Amersham) tous deux conjugués à la peroxydase. La membrane est ensuite lavée et mise en présence d'ECL (Amersham Biosciences) avant d'être révélée à l'aide d'un film photographique. Les films sont développés puis scannés et quantifiés par le logiciel ImageQuant™.

D) Immunofluorescence

Les cellules sont placées sur des lamelles dans des boites contenant 24 puits à une concentration de $5x10^4$ cellules par puits. Au bout de 24 heures, les cellules sont tout d'abord lavées avec du PBS 1X. Elles sont ensuite fixées avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 5 minutes à température ambiante puis incubées dans de la glace avec du méthanol pur froid pendant 20 minutes. Les cellules sont perméabilisées avec 0,1 % de Triton X-100 dans du PBS 2 fois 5 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont saturées pendant 30 minutes à température ambiante avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de BSA, 0,1 % de Triton X-100 dans du PBS 1X. Après trois lavages, avec du PBS 1X, les lamelles sont incubées avec un anticorps primaire pendant 30 minutes à 37°C puis lavées avec du PBS 1X avant d'être incubées avec un anticorps secondaire. Après trois lavages, les cellules sont recouvertes d'un milieu de montage contenant de la résine Fluoromount G (17984-25, electron microscopy sciences) et du DAPI (400 $ng.ml^{-1}$).

E) Extraction d'ARN et PCR en temps réel

Les ARN totaux sont extraits des cellules à l'aide du kit Rneasy (Qiagen, Courtaboeuf, France) et traités avec de la DNAse I (Promega). Après l'extraction, les ARN totaux sont vérifiés sur un gel d'agarose 1,2 % contenant 1mg.ml^{-1} de bromure d'éthydium et quantifiés. 100 ng d'ARN sont rétro-transcrits en utilisant des amorces aléatoires et un kit de RT-PCR (Roche Molecular Biochemicals). Les PCR en temps réel sont effectuées à l'aide d'un appareil Light Cycler 2.0 (Roche Molecular Diagnostics). Les amorces (concentration finale de 0,5 µM), du $MgCl_2$ (4 mM) ainsi que l'ADN sont ajoutés à une solution commerciale qui contient la Taq polymérase et des deoxyribonucleoside triphosphates SYBR-Green I (Light Cycler DNA master SYBR green I, Roche Molecular Biochemicals). 45 cycles de dénaturation (95°C, 1s), d'hybridation (58°C, 10s) et d'extension (72°C, 10s) sont effectués. La β-actine ainsi que l'ARNr 18S sont analysés et utilisés comme standards internes pour la quantification des ARN d'intérêts. Les amorces ont été déterminées par le logiciel Primer 3 et les séquences sont données dans le **tableau 5**.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
nucléoline	ACCCAGGGGATCACCTAATG	CCTTTGGAGGACCCAGTTTC
β-actine	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
18S	GAGCTAATACATGCCGACGG	ATCGGCCCGAGGTTATCTAG
45S	ACCTGTCGTCGGAGAGGTT	GACGCGCGAGAGAACAGCA
p53	TGCTTGCAATAGGTGTGCGT	GGCCCCTACCTACCTAGAAT

Tableau 5 : *Séquences des amorces utilisées pour l'expérience de RT-PCR.*

F) Northern blot

L'analyse par Northern blot a essentiellement été réalisée comme décrites par Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Brièvement, 6 µg d'ARN totaux sont séparés à l'aide d'un gel d'agarose 1 % dénaturant, transférés sur une membrane de nylon (Hybond N, Amercham Biosciences) et fixés par les ultraviolet (254 nm, 1 minute). La membrane est ensuite hybridée avec une sonde antisens marquée avec de l'γATP [P^{32}]. Cette sonde est complémentaire d'une séquence située dans la partie 5' en amont du premier site de coupure

du pré-ARNr. La séquence de la sonde est : 5'-A-ACA-GCA-GGC-CCG-CGG-GCC-GCG-GCA-GGC-GGC-TCA-3'. Après hybridation, la membrane est dans un premier temps lavée 2 fois 30 minutes à 42°C (100 mM HCl pH 7, 300 mM NaCl, 30 mM citrate de sodium, 0,1 % SDS). Dans un second temps, la membrane est lavée 2 fois 30 minutes à température ambiante avec un tampon (0,1X SSC et 0,1 % de SDS). La sonde est déshybridée de la membrane à l'aide d'une solution contenant 0,1X SSC et 0,1 % de SDS à 90°C pendant 10 minutes. La membrane est ensuite réhybridée avec la sonde β-actine pour la normalisation. Pour cette expérience, les sondes sont générées par PCR à partir de cDNA. Les sondes β-actine utilisée pour la PCR sont les mêmes que pour l'expérience de RT-PCR (**tableau 5**). L'analyse quantitative du Northern blot est réalisée à l'aide d'un appareil phosphoimager STORM 860 (Molecular Dynamics) et du logiciel ImageQuant™.

G) Analyse du cycle cellulaire

Pour analyser le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase du cycle, $1x10^6$ cellules sont collectées par trypsinisation, fixées (éthanol 70 %) et lavées (PBS 1X). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1 ml de PBS 1X contenant $1mg.ml^{-1}$ de RNAse et 50 $\mu g.ml^{-1}$ d'iodure de propydium et incubées dans le noir pendant 30 minutes à 37°C. L'analyse est effectuée à l'aide d'un appareil FACScan de Becton-Dickinson (Lincoln, NJ). Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminé grâce à l'utilisation du logiciel ModFit™.

H) Détection de l'apoptose

L'expérience de "TUNNEL assay" (promega) est utilisée pour identifier les cellules apoptotiques. Le protocole recommandé a été suivi. Brièvement, les cellules sont récupérées par trypsinisation, lavées deux fois au PBS 1X et placées sur des lames de verre par une cytocentrifugeuse. Les cellules sont fixées avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS 1X pendant 25 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite perméabilisées avec 0,2 % de Triton X-100 dans du PBS 1X pendant 10 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées dans un tampon d'équilibration pendant 10 minutes puis dans une solution contenant de l'UTP marqué à la fluorescéine et de la terminal déoxynucleotidyl transférase (TdT) qui marque l'extrémité 3'OH des fragments d'ADN. Les lames sont placées

à 37°C pendant 1 heure dans une chambre humide dans le noir. La réaction est arrêtée en immergeant les lames dans une solution SSC (100 mM HCl pH 7, 300 mM 2XNaCl, 30 mM citrate de sodium, 0,1 % SDS) pendant 15 minutes. Après trois lavages au PBS 1X, les lames sont recouvertes d'un milieu de montage Fluoromount G contenant du DAPI à une concentration finale de 400 $ng.ml^{-1}$. Les lames sont observées à l'aide d'un microscope de fluorescence (Leica DM IRB). Au moins 400 cellules ont été comptées pour chaque condition. Deux expériences différentes ont été réalisées.

Chapitre 5 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, D. W., Ivanova, V. S., Wang, X., Bonner, W. M. & Ausio, J. (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem* **276**, 41945-41949.

Abbott, D. W., Chadwick, B. P., Thambirajah, A. A. & Ausio, J. (2005). Beyond the Xi: macroH2A chromatin distribution and post-translational modification in an avian system. *J Biol Chem* **280**, 16437-16445.

Agelopoulos, M. & Thanos, D. (2006). Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *Embo J* **25**, 4843-4853.

Alberts, B. & *et.al* (1998). *Essential Cell Biology*.

Allain, F. H., 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, F. H., Gilbert, D. E., 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.

Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M. & Lamond, A. I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**, 1-11.

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

Angelov, D., Molla, A., Perche, P. Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P. & Dimitrov, S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* **11**, 1033-1041.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C. M., Studitsky, V. M., Hamiche, A., Roeder, R. G., Bouvet, P. & Dimitrov, S. (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J* **23**, 3815-3824.

Angelov, D., Bondarenko, V. A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V. M., Hamiche, A., Dimitrov, S. & Bouvet, P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* **25**, 1669-1679.

Aprikian, P., Moorefield, B. & Reeder, R. H. (2001). New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol Cell Biol* **21**, 4847-4855.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y. J., Rosu, S., Dyer, P. N., Rangasamy, D., Tremethick, D. J., Laybourn, P. J. & Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *Embo J* **23**, 3314-3324.

Bartlett, J., Blagojevic, J., Carter, D., Eskiw, C., Fromaget, M., Job, C., Shamsher, M., Trindade, I. F., Xu, M. & Cook, P. R. (2006). Specialized transcription factories. *Biochem Soc Symp*, 67-75.

Bassing, C. H., Suh, H., Ferguson, D. O., Chua, K. F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C. & Alt, F. W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**, 359-370.

Becker, P. B. (2002). Nucleosome sliding: facts and fiction. *Embo J* **21**, 4749-4753.

Beckmann, H., Chen, J. L., O'Brien, T. & Tjian, R. (1995). Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science* **270**, 1506-1509.

Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. & Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14173-14178.

Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F. & Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* **265**, 2096-2098.

Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. & Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8695-8700.

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

Birney, E., Kumar, S. & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res* **21**, 5803-5816.

Blower, M. D., Sullivan, B. A. & Karpen, G. H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* **2**, 319-330.

Boggs, B. A., Cheung, P., Heard, E., Spector, D. L., Chinault, A. C. & Allis, C. D. (2002). Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* **30**, 73-76.

Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B. & Amalric, F. (1984). Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res* **12**, 3025-3035.

Bourgeois, C. A. & Hubert, J. (1988). Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspects and functional significance. *Int Rev Cytol* **111**, 1-52.

Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J. & Amalric, F. (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* **273**, 19025-19029.

Boyer, L. A., Shao, X., Ebright, R. H. & Peterson, C. L. (2000). Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)(2) tetramer in nucleosome remodeling by the SWI-SNF complex. *J Biol Chem* **275**, 11545-11552.

Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y., Winston, F. & Allis, C. D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev* **15**, 3286-3295.

Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z. W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D. & Strahl, B. D. (2002). Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498.

Brinkman, A. B., Roelofsen, T., Pennings, S. W., Martens, J. H., Jenuwein, T. & Stunnenberg, H. G. (2006). Histone modification patterns associated with the human X chromosome. *EMBO Rep* **7**, 628-634.

Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H. & Amalric, F. (1982). Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem* **128**, 475-480.

Caburet, S., Conti, C., Schurra, C., Lebofsky, R., Edelstein, S. J. & Bensimon, A. (2005). Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res* **15**, 1079-1085.

Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M. J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Eckhaus, M., Ried, T., Bonner, W. M. & Nussenzweig, A. (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**, 371-383.

Chadwick, B. P., Valley, C. M. & Willard, H. F. (2001a). Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res* **29**, 2699-2705.

Chadwick, B. P. & Willard, H. F. (2001b). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**, 375-384.

Chadwick, B. P. & Willard, H. F. (2001c). Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet* **10**, 1101-1113.

Chadwick, B. P. & Willard, H. F. (2002). Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **157**, 1113-1123.

Chakravarthy, S., Gundimella, S. K., Caron, C., Perche, P. Y., Pehrson, J. R., Khochbin, S. & Luger, K. (2005). Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **25**, 7616-7624.

Chen, D. & Huang, S. (2001). Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* **153**, 169-176.

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M. & Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**, 905-915.

Cheutin, T. (2004). Dynamics of nucleolar components. In *The nucleolus*, pp. 1036-1038. Edited by M. O. J. Olson.

Chooi, W. Y. & Leiby, K. R. (1981). An electron microscopic method for localization of ribosomal proteins during transcription of ribosomal DNA: a method for studying protein assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4823-4827.

Chu, F., Nusinow, D. A., Chalkley, R. J., Plath, K., Panning, B. & Burlingame, A. L. (2006). Mapping post-translational modifications of the histone variant MacroH2A1 using tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **5**, 194-203.

Cmarko, D., Verschure, P. J., Rothblum, L. I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R. & Fakan, S. (2000). Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol* **113**, 181-187.

Comai, L., Tanese, N. & Tjian, R. (1992). The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* **68**, 965-976.

Comai, L. (1999). The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1473-1478.

Comai, L. (2004). Mechanism of RNA polymerase I transcription. *Adv Protein Chem* **67**, 123-155.

Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T. & Sogo, J. M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**, 753-761.

Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science* **284**, 1790-1795.

Costanzi, C., Stein, P., Worrad, D. M., Schultz, R. M. & Pehrson, J. R. (2000). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* **127**, 2283-2289.

Costanzi, C. & Pehrson, J. R. (2001). MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J Biol Chem* **276**, 21776-21784.

Coute, Y., Burgess, J. A., Diaz, J. J., Chichester, C., Lisacek, F., Greco, A. & Sanchez, J. C. (2006). Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom Rev* **25**, 215-234.

Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. & Cremer, T. (2001). Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* **9**, 541-567.

Crocker, J. (1996). Molecular and biochemical aspects of interphase nucleolar organiser regions. *Clin Mol Pathol* **49**, M8-M11.

Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. & Bickmore, W. A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* **145**, 1119-1131.

De, A., Donahue, S. L., Tabah, A., Castro, N. E., Mraz, N., Cruise, J. L. & Campbell, C. (2006). A novel interaction [corrected] of nucleolin with Rad51. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 206-213.

de Napoles, M., Mermoud, J. E., Wakao, R., Tang, Y. A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T. B., Silva, J., Otte, A. P., Vidal, M., Koseki, H. & Brockdorff, N. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**, 663-676.

Derenzini, M., Pession, A. & Trere, D. (1990). Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* **63**, 137-140.

Derenzini, M., Sirri, V., Trere, D. & Ochs, R. L. (1995). The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest* **73**, 497-502.

Dhillon, N. & Kamakaka, R. T. (2000). A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol Cell* **6**, 769-780.

Dillon, N. (2004). Heterochromatin structure and function. *Biol Cell* **96**, 631-637.

Doyen, C. M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V. M., Hamiche, A., Roeder, R. G., Bouvet, P. & Dimitrov, S. (2006a). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **26**, 1156-1164.

Doyen, C. M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Bouvet, P. & Dimitrov, S. (2006b). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *Embo J* **25**, 4234-4244.

Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F. & Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**, 967-970.

Dundr, M. & Raska, I. (1993). Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus. *Exp Cell Res* **208**, 275-281.

Dundr, M., Misteli, T. & Olson, M. O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* **150**, 433-446.

Dundr, M., Hoffmann-Rohrer, U., Hu, Q., Grummt, I., Rothblum, L. I., Phair, R. D. & Misteli, T. (2002). A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* **298**, 1623-1626.

Edwards, T. K., Saleem, A., Shaman, J. A., Dennis, T., Gerigk, C., Oliveros, E., Gartenberg, M. R. & Rubin, E. H. (2000). Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *J Biol Chem* **275**, 36181-36188.

Egyhazi, E., Pigon, A., Chang, J. H., Ghaffari, S. H., Dreesen, T. D., Wellman, S. E., Case, S. T. & Olson, M. O. (1988). Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in Chironomus salivary gland cells. *Exp Cell Res* **178**, 264-272.

Eils, R., Dietzel, S., Bertin, E., Schrock, E., Speicher, M. R., Ried, T., Robert-Nicoud, M., Cremer, C. & Cremer, T. (1996). Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* **135**, 1427-1440.

Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* **175**, 525-530.

Escande, M. L., Gas, N. & Stevens, B. J. (1985). Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biol Cell* **53**, 99-109.

Evers, R. & Grummt, I. (1995a). Molecular coevolution of mammalian ribosomal gene terminator sequences and the transcription termination factor TTF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5827-5831.

Evers, R., Smid, A., Rudloff, U., Lottspeich, F. & Grummt, I. (1995b). Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *Embo J* **14**, 1248-1256.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T. C., Beall, J., Wells, J. R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P. D., Tremethick, D. J. & Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* **11**, 1183-1187.

Fernandez-Capetillo, O., Allis, C. D. & Nussenzweig, A. (2004). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med* **199**, 1671-1677.

Finger, L. D., Johansson, C., Rinaldi, B., Bouvet, P. & Feigon, J. (2004). Contributions of the RNA-binding and linker domains and RNA structure to the specificity and affinity of the nucleolin RBD12/NRE interaction. *Biochemistry* **43**, 6937-6947.

Friedrich, J. K., Panov, K. I., Cabart, P., Russell, J. & Zomerdijk, J. C. (2005). TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* **280**, 29551-29558.

Fritzsche, W., Schaper, A. & Jovin, T. M. (1995). Scanning force microscopy of chromatin fibers in air and in liquid. *Scanning* **17**, 148-155.

Gabellini, D., Green, M. R. & Tupler, R. (2002). Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* **110**, 339-348.

Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. & Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* **270**, 17923-17928.

Gas, N., Escande, M. L. & Stevens, B. J. (1985). Immunolocalization of the 100 kDa nucleolar protein during the mitotic cycle in CHO cells. *Biol Cell* **53**, 209-218.

Gaudreault, I., Guay, D. & Lebel, M. (2004). YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res* **32**, 316-327.

Gautier, T., Abbott, D. W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J. & Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep* **5**, 715-720.

Georges, S. A., Kraus, W. L., Luger, K., Nyborg, J. K. & Laybourn, P. J. (2002). p300-mediated tax transactivation from recombinant chromatin: histone tail deletion mimics coactivator function. *Mol Cell Biol* **22**, 127-137.

Gerber, M. & Shilatifard, A. (2003). Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem* **278**, 26303-26306.

Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Puvion-Dutilleul, F., Amalric, F. & Bouvet, P. (1996). Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J Mol Biol* **260**, 34-53.

Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F. & Erard, M. (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem* **209**, 541-548.

Gilbert, S. L. & Sharp, P. A. (1999). Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13825-13830.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-2059.

Ginisty, H., Amalric, F. & Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J* **17**, 1476-1486.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112 (Pt 6)**, 761-772.

Ginisty, H., Amalric, F. & Bouvet, P. (2001). Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* **276**, 14338-14343.

Goodpasture, C. & Bloom, S. E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions im mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**, 37-50.

Gottesfeld, J. M., Belitsky, J. M., Melander, C., Dervan, P. B. & Luger, K. (2002). Blocking transcription through a nucleosome with synthetic DNA ligands. *J Mol Biol* **321**, 249-263.

Grummt, I. & Pikaard, C. S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 641-649.

Gueroui, Z., Place, C., Freyssingeas, E. & Berge, B. (2002). Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6005-6010.

Haaf, T. & Ward, D. C. (1994). Structural analysis of alpha-satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet* **3**, 697-709.

Habermann, F. A., Biet, C. & Fries, R. (2001). Chromosomal localization of the genes encoding SCNN1A, BTG1, IFNG and MAOA on chicken chromosome 1 by fluorescence in-situ hybridization. *Chromosome Res* **9**, 515-518.

Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P. & Prunell, A. (1996). Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J Mol Biol* **257**, 30-42.

Hanada, K., Song, C. Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K. & Muramatsu, M. (1996). RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *Embo J* **15**, 2217-2226.

Hanakahi, L. A., Dempsey, L. A., Li, M. J. & Maizels, N. (1997). Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3605-3610.

Hatch, C. L. & Bonner, W. M. (1990). The human histone H2A.Z gene. Sequence and regulation. *J Biol Chem* **265**, 15211-15218.

Heard, E., Rougeulle, C., Arnaud, D., Avner, P., Allis, C. D. & Spector, D. L. (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* **107**, 727-738.

Hebbes, T. R., Thorne, A. W. & Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* **7**, 1395-1402.

Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T. M. & Grummt, I. (1998). Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *Embo J* **17**, 7373-7381.

Henderson, A. S., Warburton, D. & Atwood, K. C. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3394-3398.

Henderson, S. L. & Sollner-Webb, B. (1990). The mouse ribosomal DNA promoter has more stringent requirements in vivo than in vitro. *Mol Cell Biol* **10**, 4970-4973.

Hernandez-Verdun, D. & Louvet, E. (2004). [The nucleolus: structure, functions, amd associated diseases]. *Med Sci (Paris)* **20**, 37-44.

Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* **126**, 135-148.

Herschlag, D. (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem* **270**, 20871-20874.

Hozak, P., Novak, J. T. & Smetana, K. (1989). Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biol Cell* **66**, 225-233.

Hozak, P., Cook, P. R., Schofer, C., Mosgoller, W. & Wachtler, F. (1994). Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* **107 (Pt 2)**, 639-648.

Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M. & Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291.

Huang, S. (2002). Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* **157**, 739-741.

Huang, S. Y., Barnard, M. B., Xu, M., Matsui, S., Rose, S. M. & Garrard, W. T. (1986). The active immunoglobulin kappa chain gene is packaged by non-ubiquitin-conjugated nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3738-3742.

Hubbell, H. R. (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol* **60**, 285-294.

Iizuka, M. & Smith, M. M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 154-160.

Jansa, P., Mason, S. W., Hoffmann-Rohrer, U. & Grummt, I. (1998). Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *Embo J* **17**, 2855-2864.

Jansa, P. & Grummt, I. (1999). Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet* **262**, 508-514.

Jansa, P., Burek, C., Sander, E. E. & Grummt, I. (2001). The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **29**, 423-429.

Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

Jeppesen, P., Mitchell, A., Turner, B. & Perry, P. (1992). Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma* **101**, 322-332.

Jeppesen, P. & Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**, 281-289.

Jimenez-Garcia, L. F., Segura-Valdez, M. L., Ochs, R. L., Rothblum, L. I., Hannan, R. & Spector, D. L. (1994). Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* **5**, 955-966.

Kleinschmidt, J. A. & Steinbeisser, H. (1991). DNA-dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in Xenopus laevis oocytes: involvement of protein phosphorylation in nucleosome spacing. *Embo J* **10**, 3043-3050.

Klose, R. J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. & Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**, 312-316.

Kubicek, S. & Jenuwein, T. (2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell* **119**, 903-906.

Kuhn, A. & Grummt, I. (1987). A novel promoter in the mouse rDNA spacer is active in vivo and in vitro. *Embo J* **6**, 3487-3492.

Kuhn, A., Deppert, U. & Grummt, I. (1990). A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7527-7531.

Kuhn, A., Vente, A., Doree, M. & Grummt, I. (1998). Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol* **284**, 1-5.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., 3rd, Abmayr, S. M., Washburn, M. P. & Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**, 2084-2087.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.

Lalev, A. I. & Nazar, R. N. (2001). A chaperone for ribosome maturation. *J Biol Chem* **276**, 16655-16659.

Larochelle, M. & Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *Embo J* **22**, 4512-4522.

Latonen, L. & Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* **1755**, 71-89.

Lazdins, I. B., Delannoy, M. & Sollner-Webb, B. (1997). Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* **105**, 481-495.

Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D. & Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84.

Leung, A. K., Gerlich, D., Miller, G., Lyon, C., Lam, Y. W., Lleres, D., Daigle, N., Zomerdijk, J., Ellenberg, J. & Lamond, A. I. (2004). Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* **166**, 787-800.

Levinger, L. & Varshavsky, A. (1982). Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome. *Cell* **28**, 375-385.

Li, J., Lin, Q., Yoon, H. G., Huang, Z. Q., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Wong, J. (2002). Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* **22**, 5688-5697.

Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R. & Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**, 917-926.

Lorsch, J. R. (2002). RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* **109**, 797-800.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389**, 251-260.

Ma, Y., Jacobs, S. B., Jackson-Grusby, L., Mastrangelo, M. A., Torres-Betancourt, J. A., Jaenisch, R. & Rasmussen, T. P. (2005). DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. *J Cell Sci* **118**, 1607-1616.

Maden, B. E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **39**, 241-303.

Mais, C. & Scheer, U. (2001). Molecular architecture of the amplified nucleoli of Xenopus oocytes. *J Cell Sci* **114**, 709-718.

Mannironi, C., Bonner, W. M. & Hatch, C. L. (1989). H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* **17**, 9113-9126.

Mason, S. W., Sander, E. E. & Grummt, I. (1997). Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *Embo J* **16**, 163-172.

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

Melese, T. & Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 319-324.

Mermoud, J. E., Popova, B., Peters, A. H., Jenuwein, T. & Brockdorff, N. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* **12**, 247-251.

Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J. S. & Bensimon, A. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277**, 1518-1523.

Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* **20**, 711-722.

Miller, G., Panov, K. I., Friedrich, J. K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I. & Zomerdijk, J. C. (2001). hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *Embo J* **20**, 1373-1382.

Miller, O. L., Jr. & Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**, 955-957.

Miller, O. L., Jr. (1981). The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J Cell Biol* **91**, 15s-27s.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S. & Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.

Moorefield, B., Greene, E. A. & Reeder, R. H. (2000). RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4724-4729.

Mosgoeller (2004). Nucleolar Ultrasructure in Vertebrates. In *The nucleolus*. Edited by m. O. J. Olson.

Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A. & Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* **7**, 1609-1619.

Murray, K. (1964). The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* **3**, 10-15.

Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I. & Voit, R. (2001). Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J* **20**, 1353-1362.

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-113.

Neely, K. E. & Workman, J. L. (2002). The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 19-29.

Nemeth, A., Strohner, R., Grummt, I. & Langst, G. (2004). The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**, 4091-4099.

Nickel, B. E., Allis, C. D. & Davie, J. R. (1989). Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry* **28**, 958-963.

Nowak, S. J. & Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**, 214-220.

O'Neill, L. P. & Turner, B. M. (1995). Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *Embo J* **14**, 3946-3957.

Olson, M. O., Rivers, Z. M., Thompson, B. A., Kao, W. Y. & Case, S. T. (1983a). Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **22**, 3345-3351.

Olson, M. O. & Thompson, B. A. (1983b). Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* **22**, 3187-3193.

Orrick, L. R., Olson, M. O. & Busch, H. (1973). Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1316-1320.

Osley, M. A., Fleming, A. B. & Kao, C. F. (2006). Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ* **41**, 47-75.

Panov, K. I., Panova, T. B., Gadal, O., Nishiyama, K., Saito, T., Russell, J. & Zomerdijk, J. C. (2006). RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol* **26**, 5436-5448.

Pasero, P., Bensimon, A. & Schwob, E. (2002). Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* **16**, 2479-2484.

Peculis, B. A. & Steitz, J. A. (1993). Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the Xenopus oocyte. *Cell* **73**, 1233-1245.

Pehrson, J. R. & Fried, V. A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**, 1398-1400.

Pehrson, J. R., Costanzi, C. & Dharia, C. (1997). Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* **65**, 107-113.

Perche, P. Y., Vourc'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. & Khochbin, S. (2000). Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol* **10**, 1531-1534.

Perche, P. Y., Robert-Nicoud, M., Khochbin, S. & Vourc'h, C. (2003). [Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants]. *Med Sci (Paris)* **19**, 1137-1145.

Pestov, D. G., Strezoska, Z. & Lau, L. F. (2001). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* **21**, 4246-4255.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. & Nigg, E. A. (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**, 791-801.

Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J. H. & Jenuwein, T. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**, 1577-1589.

Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. & Riva, M. (2000). The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* **19**, 5473-5482.

Phair, R. D. & Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**, 604-609.

Philpott, A., Krude, T. & Laskey, R. A. (2000). Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 7-14.

Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F. J., Echeverria, M. & Saez-Vasquez, J. (2006). Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in Arabidopsis. *Mol Biol Cell*.

Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J. P., Bernadac, A. & Zalta, J. P. (1977). [Transcription complexes in subnuclear fractions isolated from mammalian cells: ultrastructural study]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **284**, 663-666.

Raska, I. (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* **13**, 517-525.

Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H. & Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* **96**, 579-594.

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

Rhodes, D. (1997). Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up. *Nature* **389**, 231, 233.

Rice, J. C. & Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 263-273.

Rice, J. C., Briggs, S. D., Ueberheide, B., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Shinkai, Y. & Allis, C. D. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**, 1591-1598.

Rickards, B., Flint, S. J., Cole, M. D. & Leroy, G. (2006). Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol*.

Ritossa, F. M. & 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.

Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-916.

Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. & Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**, 9390-9395.

Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. & Bouvet, P. (2002). Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* **277**, 10209-10219.

Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F. & Hernandez-Verdun, D. (1992). Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp Cell Res* **203**, 259-269.

Roussel, P., Andre, C., Masson, C., Geraud, G. & Hernandez-Verdun, D. (1993). Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* **104 (Pt 2)**, 327-337.

Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (1994a). Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* **214**, 465-472.

Roussel, P., Sirri, V. & Hernandez-Verdun, D. (1994b). Quantification of Ag-NOR proteins using Ag-NOR staining on western blots. *J Histochem Cytochem* **42**, 1513-1517.

Roussel, P., Andre, C., Comai, L. & Hernandez-Verdun, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**, 235-246.

Rubbi, C. P. & Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo J* **22**, 6068-6077.

Russell, J. & Zomerdijk, J. C. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**, 87-96.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Santisteban, M. S., Kalashnikova, T. & Smith, M. M. (2000). Histone H2A.Z regulats transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* **103**, 411-422.

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

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

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J. & Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411.

Santos-Rosa, H. & Caldas, C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2381-2402.

Sauve, D. M., Anderson, H. J., Ray, J. M., James, W. M. & Roberge, M. (1999). Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* **145**, 225-235.

Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B. & Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* **153**, 1097-1110.

Saxena, A., Rorie, C. J., Dimitrova, D., Daniely, Y. & Borowiec, J. A. (2006). Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene*.

Scheer, U. & Benavente, R. (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* **12**, 14-21.

Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D. & Diaz, J. J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* **13**, 4100-4109.

Schmidt-Zachmann, M. S. & Nigg, E. A. (1993). Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**, 799-806.

Schnapp, G., Schnapp, A., Rosenbauer, H. & Grummt, I. (1994). TIF-IC, a factor involved in both transcription initiation and elongation of RNA polymerase I. *Embo J* **13**, 4028-4035.

Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C. & Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**, 73-77.

Schofer, C., Weipoltshammer, K., Almeder, M., Muller, M. & Wachtler, F. (1996). Redistribution of ribosomal DNA after blocking of transcription induced by actinomycin D. *Chromosome Res* **4**, 384-391.

Schwab, M. S. & Dreyer, C. (1997). Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *Eur J Cell Biol* **73**, 287-297.

Seinsoth, S., Uhlmann-Schiffler, H. & Stahl, H. (2003). Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I. *EMBO Rep* **4**, 263-268.

Serin, G., Joseph, G., Faucher, C., Ghisolfi, L., Bouche, G., Amalric, F. & Bouvet, P. (1996). Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* **78**, 530-538.

Serin, G., Joseph, G., Ghisolfi, L., Bauzan, M., Erard, M., Amalric, F. & Bouvet, P. (1997). Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* **272**, 13109-13116.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. & Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.

Shiio, Y. & Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13225-13230.

Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**, 243-269.

Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K. & Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**, 629-639.

Sipos, K. & Olson, M. O. (1991). Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 673-678.

Sirri, V., Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (1999). The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci* **112 (Pt 19)**, 3259-3268.

Sirri, V., Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (2000). In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* **148**, 259-270.

Spada, F., Vincent, M. & Thompson, E. M. (2005). Plasticity of histone modifications across the invertebrate to vertebrate transition: histone H3 lysine 4 trimethylation in heterochromatin. *Chromosome Res* **13**, 57-72.

Spector, D. L., Ochs, R. L. & Busch, H. (1984). Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* **90**, 139-148.

Stanek, D., Koberna, K., Pliss, A., Malinsky, J., Masata, M., Vecerova, J., Risueno, M. C. & Raska, I. (2001). Non-isotopic mapping of ribosomal RNA synthesis and processing in the nucleolus. *Chromosoma* **110**, 460-470.

Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Langst, G. & Grummt, I. (2001). NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J* **20**, 4892-4900.

Strohner, R., Nemeth, A., Nightingale, K. P., Grummt, I., Becker, P. B. & Langst, G. (2004). Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol* **24**, 1791-1798.

Sullivan, B. A. & Karpen, G. H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1076-1083.

Sun, H. B., Shen, J. & Yokota, H. (2000). Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* **79**, 184-190.

Sun, Z. W. & Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**, 104-108.

Suto, R. K., Clarkson, M. J., Tremethick, D. J. & Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* **7**, 1121-1124.

Tanabe, H., Habermann, F. A., Solovei, I., Cremer, M. & Cremer, T. (2002). Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res* **504**, 37-45.

Thiry, M., Cheutin, T., O'Donohue, M. F., Kaplan, H. & Ploton, D. (2000). Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *Rna* **6**, 1750-1761.

Thoma, F., Koller, T. & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* **83**, 403-427.

Trere, D., Pession, A. & Derenzini, M. (1989). The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* **184**, 131-137.

Tuan, J. C., Zhai, W. & Comai, L. (1999). Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**, 2872-2879.

Turner, B. M., Birley, A. J. & Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei. *Cell* **69**, 375-384.

Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A. & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**, 381-391.

van Holde, K. & Zlatanova, J. (1995). Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J Biol Chem* **270**, 8373-8376.

Vera, M. I., Norambuena, L., Alvarez, M., Figueroa, J., Molina, A., Leon, G. & Krauskopf, M. (1993). Reprogramming of nucleolar gene expression during the acclimatization of the carp. *Cell Mol Biol Res* **39**, 665-674.

Voit, R., Hoffmann, M. & Grummt, I. (1999). Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo J* **18**, 1891-1899.

Wachtler, F., Schofer, C., Mosgoller, W., Weipoltshammer, K., Schwarzacher, H. G., Guichaoua, M., Hartung, M., Stahl, A., Berge-Lefranc, J. L., Gonzalez, I. & et al. (1992). Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli: light and electron microscopic in situ hybridization in human Sertoli cells. *Exp Cell Res* **198**, 135-143.

Wang, Y., Guan, J., Wang, H., Wang, Y., Leeper, D. & Iliakis, G. (2001). Regulation of dna replication after heat shock by replication protein a-nucleolin interactions. *J Biol Chem* **276**, 20579-20588.

Ward, I. M. & Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**, 47759-47762.

Weisenberger, D. & Scheer, U. (1995). A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol* **129**, 561-575.

Yang, T. H., Tsai, W. H., Lee, Y. M., Lei, H. Y., Lai, M. Y., Chen, D. S., Yeh, N. H. & Lee, S. C. (1994). Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Mol Cell Biol* **14**, 6068-6074.

Ying, G. G., Proost, P., van Damme, J., Bruschi, M., Introna, M. & Golay, J. (2000). Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity. *J Biol Chem* **275**, 4152-4158.

Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H. J., Schutz, G. & Grummt, I. (2005). Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* **19**, 77-87.

Zhang, H., Roberts, D. N. & Cairns, B. R. (2005a). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**, 219-231.

Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D. & Adams, P. D. (2005b). Formation of MacroH2A-

containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19-30.

Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360.

Zhou, Y., Santoro, R. & Grummt, I. (2002). The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *Embo J* **21**, 4632-4640.

Zimmer, C. & Wahnert, U. (1986). Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. *Prog Biophys Mol Biol* **47**, 31-112.

ANNEXE

I) Programme de calcul des distances entre deux points successifs

```
close all;
clc;

repertoire='Nom du répertoire'
cd(repertoire);

[fichier,chemin]=uigetfile('*.tif','Quel Fichier Nano3 voulez-vous traiter
?','MultiSelect','on');
cd(chemin);
stat_tot=[];

for count=1:length(fichier)
Figure=imread(fichier{count});

%% Acquisition du tracé de la fibre

carre=25;
h = fspecial('gaussian',300,carre);
Figure_lissee=imfilter(Figure,h);
Figure=Figure-Figure_lissee;

imagesc(Figure);
%colormap(gray);
xi=[];
yi=[];
butt=0;

while butt~=3
[x,y,butt]=ginput(1);
imagesc(BbdGFP);
%colormap(gray);

xi=[xi,x];
yi=[yi,y];

hold on;
plot(xi,yi,'.');

end

%% Lissage et Re-échantillonage du contour

mini=min(xi);maxi=max(xi);delta=maxi-mini;
xx=mini+(0:delta/20:delta);

yy=spline(xi,yi,xx);

hold on;
plot(xx,yy);

s=[0,cumsum(sqrt(diff(xx).^2+diff(yy).^2))];
```

```
mini=min(s);maxi=max(s);delta=maxi-mini;
ss=mini+(0:delta/600:delta);

xx_ren=spline(s,xx,ss);
yy_ren=spline(s,yy,ss);

hold on;
plot(xx_ren,yy_ren,'r');
profile=[];

%% Calcul du profil d'intensité

for i=1:length(ss)

if (yy_ren(i)>5)&(yy_ren(i)<(size(Figure,2)-
5))&(xx_ren(i)>5)&(xx_ren(i)<(size(Figure,1)-5))
l=[Figure(floor((yy_ren(i)-5):(yy_ren(i)+5)),floor((xx_ren(i)-
5):(xx_ren(i)+5)))];
profile_Bbd(i)=mean(l(:));

else
profile_Bbd(i)=0;

end

end

figure;
Bbd_ren=profile_Bbd

plot(ss,Bbd_ren);

%% Recherche des maximums locaux

[b,a_bbd]=lmax(profile_Bbd,5);

hold on;
plot(ss(a_bbd),Bbd_ren(a_bbd),'r+');

p_voisin_bbdz=diff(xx_ren(a_bbd));
p_voisin_Bbd_ren = diff(yy_ren(a_bbd));
p_voisin= (p_voisin_bbdz).^2 + (p_voisin_Bbd_ren).^2;
p_voisin_bbd = sqrt(p_voisin);
filename = strcat(fichier{count}, '.mat');
save (filename, 'p_voisin_bbd', '-ascii', '-tabs');
stat_tot=[stat_tot,p_voisin_bbd];

%% Statistique des distances entre premiers voisins

figure; hist(p_voisin_bbd);

figure;
imagesc(Figure);
% ;colormap(gray);
hold on;
plot(xx_ren(a_bbd),yy_ren(a_bbd),'b*');
% plot(xx_ren(a_meth),yy_ren(a_meth),'r*')
```

```
end

close all;
figure;
hist(stat_tot);

%% Calcul de la moyenne, de l'écart type et du nombre d'évènements

function [moyenne,ecart_type,N]=calc_hist()

f=get(gco,'XData');
f=mean(f);
p=get(gco,'YData');
p=max(p);

moyenne=sum(f.*p)./sum(p);

ecart_type=sqrt(sum((f-moyenne).^2.*p)./sum(p));

N=sum(p);
disp('moyenne');
disp(moyenne);
disp('ecart type');
disp(ecart_type);
disp('N');
disp(N);

end
```

II) Programme de calcul de l'autocorrélation et de la corrélation croisée

```
close all;
clc;

repertoire='Nom du répertoire'
cd(repertoire);

[fichier,chemin]=uigetfile('*.tif','Quel Fichier Marquage n°1 voulez-vous
traiter ?','MultiSelect','off');
cd(chemin);
Figure1=imread(fichier);

[fichier,chemin]=uigetfile('*.tif','Quel Fichier Marquage n°2 voulez-vous
traiter ?','MultiSelect','off');
cd(chemin);
Figure2=imread(fichier);

stat_tot=[];

%% Acquisition du tracé de la fibre

carre=25;
h = fspecial('gaussian',300,carre);
Figure2_lissee=imfilter(Figure2,h);
Figure2_traitee=Figure2-Figure2_lissee;

imagesc(Figure1);
```

```
%colormap(gray);
xi=[];
yi=[];
butt=0;

while butt~=3
[x,y,butt]=ginput(1);
imagesc(Figure1);
%colormap(gray);

xi=[xi,x];
yi=[yi,y];

hold all;
plot(xi,yi,'.');

end

%% Lissage et Re-échantillonage du contour

mini=min(xi);maxi=max(xi);delta=maxi-mini;
xx=mini+(0:delta/20:delta);

yy=spline(xi,yi,xx);

plot(xx,yy);
drawnow;

pause;

imagesc(Figure2_traitee)
hold all;
plot(xi,yi,'.');

plot(xx,yy);
drawnow;

pause;

s=[0,cumsum(sqrt(diff(xx).^2+diff(yy).^2))];

mini=min(s);maxi=max(s);delta=maxi-mini;
ss=mini+(0:delta/600:delta);

xx_ren=spline(s,xx,ss);
yy_ren=spline(s,yy,ss);

hold on;
plot(xx_ren,yy_ren,'r');
profile=[];

hold on;
plot(xx_ren,yy_ren,'r');

%% Calcul des profils d'intensité

for i=1:length(ss)
```

```
l=[Figure1(floor((yy_ren(i)-5):(yy_ren(i)+5)),floor((xx_ren(i)-
5):(xx_ren(i)+5)))];
profile_Bbd(i)=mean(l(:));

l=[Figure2_traitee(floor((yy_ren(i)-5):(yy_ren(i)+5)),floor((xx_ren(i)-
10):(xx_ren(i)+5)))];
profile_Meth(i)=mean(l(:));

end

figure;
Bbd_ren=(profile_Bbd-mean(profile_Bbd))./std(profile_Bbd);
Meth_ren=(profile_Meth-mean(profile_Meth))./std(profile_Meth);
plot(ss,Bbd_ren,ss,Meth_ren);

%% Correlation

figure;

corrr=conv(Bbd_ren,Meth_ren)
plot([-fliplr(ss),ss(2:end)],corrr)

for i=1:500
a=corrcoef(Meth_ren(1:end-i+1),Bbd_ren(i:end));
corr2(i)=a(2,1);

end

plot(corr2);

[fichier,chemin]=uigetfile('*.fig','Quel Fichier Marquage n°1 voulez-vous
traiter ?','MultiSelect','on');
cd(chemin);

moyenne=0;

for i=1:length(fichier)

open(fichier{i});

x=get(get(gca,'Children'),'XData');
y=get(get(gca,'Children'),'YData');

yi = interp1(x,y,1:0.5:200,'spline');

moyenne=yi+moyenne;

end

figure;
plot(64*(1:0.5:200),moyenne./length(fichier));
```