



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Biologie cellulaire et moléculaire*

Présentée et soutenue par *Coralie CARRON*
Le 18 Octobre 2010

Titre : *MATURATION DES PRÉ-RIBOSOMES HUMAINS ET
NUCLÉOGENÈSE POST-MITOTIQUE*

JURY

Danièle HERNANDEZ-VERDUN
Jean-Jacques DIAZ
Valérie DOYE
Michèle CAIZERGUES-FERRER
Marie-Françoise O'DONOHUE
Pierre-Emmanuel GLEIZES

Directeur de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, INSERM
Directeur de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, CNRS
Chargé de Recherche, CNRS
Professeur d'Université

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du Jury
Co-Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

Ecole doctorale : *EDBIO BSB*
Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote*
Directeur(s) de Thèse : *Pierre-Emmanuel GLEIZES*
Marie-Françoise O'Donohue
Rapporteurs :



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Danièle Hernandez-Verdun, Valérie Doye, Michèle Caizergues-Ferrer et Jean-Jacques Diaz.

Je tiens particulièrement à remercier Marie-Françoise et PierreM pour leur encadrement. Merci Marie-Françoise pour ta présence, ton soutien, mais également pour tous ces fous-rires que nous avons eu dans le bureau. C'était bien agréable de le partager avec toi. Merci aussi pour cette rigueur et cette organisation que tu m'as transmise (je suis d'accord, il reste encore un peu de travail). Merci PierreM pour la motivation que tu as su m'apporter, soit de manière douce, soit un peu plus fermement parfois, mais toujours justifiée cependant. Merci aussi pour toutes les discussions et les réflexions scientifiques que nous avons eues.

Merci à toi Valérie, pour tout cet apprentissage à la paillasse, toutes ces manip apprises, et les petits détails valériens à apporter pour que ça marche. C'était également bien sympa de partager le bureau et le coin paillasse avec toi.

Je tiens aussi à remercier Cap'tain Tonton, mon tonton Guillaume. Et oui, n'ayant ni oncle ni tante, j'ai arbitrairement décidé qu'il serait mon tonton ! Merci pour toutes ces connaissances que tu m'as transmises, tant au niveau de la culture G que du point de vue de la levure. En effet, à mes débuts, la levure était pour moi quelque chose qui pue (au sens littéral du terme), et qui n'est pas très évoluée. Mais c'est faux ! Les levures peuvent sentir bon le pain et la bière ! (sauf bien sûr la vieille levure, qui pue grave, elle...) Mais la levure a aussi un grand sens social, de partage et d'entraide avec ses congénères, via ses gènes dits « de barbe bleue ».

Merci à toi Célia, pour ton grand sens de l'humour déjà. Je ne verrai plus jamais le « complexe de pore nucléaire » comme tel. Tu m'as aussi permise d'amadouer un peu ma nièce en utilisant ce fameux jeu du « chapeau ! ». Merci aussi pour le partage de tes connaissances sur la microscopie électronique. Grâce à toi, j'arrive enfin à déceler des particules sur ces images de ME, que je considérais comme le grand flou neigeux d'une télé qui ne capte pas... Continue à regarder ces trucs bizarres (tu vois de quoi je parle, je ne te fais pas de dessin).

Je remercie aussi Franck, dit Frédéric, Fronk... Sous ce premier abord ronchon et caractériel (parisien quoi), tu es vraiment sympa (même si toutes les portes n'en pensent pas autant ;-)). On essaiera de te faire la fameuse compil dont tu rêves pour que tu puisses l'écouter dans ta voiture le matin. Merci aussi pour ton grand sens de l'humour.

Merci à Marlène pour avoir partagé son goût pour les voyages, mais aussi à Jacqueline et Milena.

Je remercie bien évidemment tout le LBME pour les 5 ans passés ici, pour tous ces sourires, le partage des connaissances, et la disponibilité de chacun. Merci au plateau de ME, et particulièrement Stéphanie pour les manips que nous avons faites ensemble. C'était toujours un bon moment de descendre au microscope avec toi.

Merci aussi à l'équipe Chandler du LMGM, et plus précisément à Cat, No, Ade et Édith. Cat et No, vous avez été de vraies sœurs pour moi au labo. Tous ces moments passés ensemble étaient énormes, se boire une tite binouze en fin de journée sur les marches, c'était un vrai coup de fouet pour continuer à bosser quelques heures. J'ai adoré vous rencontrer et partager tous ces moments avec vous. Même devenue docteur, je sais que je resterai pour vous la p'tite jeunette qui ne connaît rien à la vie. Édith et Ade, c'était toujours un régal de boire le café du matin avec vous. Ade la normande, qui a su nous expliquer tous les rouages de la cuisine du Caes, et qui maintenant a pris un sacré accent tarbais ! Je suis fier de ton intégration sud-ouestienne.

Maintenant, passons aux amis et à la famille.

Merci aux Morard : Mom et Hugo. Mom, ma binôme de TD, TP, et de coinche bien sûr. Binôme un jour, binôme toujours !! Merci pour ta joie de vivre, ta générosité, ton sens de la fête, bref ton amitié sans faille. Hugo, bon quand c'est que tu l'épouses ?!! Blague à part, très heureuse de te connaître et de faire partie de tes amis (enfin j'espère).

Merci à Laure et Seb. Laure, pour répondre à tes remerciements de thèse, il n'a pas fallu grand chose pour te dévergondier, je tiens à le préciser ! Ton humour, ta pêche, ta présence et ta gentillesse sont des choses précieuses et que j'apprécie énormément. Nos soirées lose en boîte ont malgré tout été une réussite (si si je t'assure), car partagées avec toi.

Floflo et Alex, ne changez rien. Toujours heureuse de vous voir. Floflo, ces années de médecine m'ont donnée la chance de te connaître. Il faut maintenant que je vienne à Bénéjacq, car j'ai quand même visité tous tes lieux de vie, sauf celui là. Vous êtes supers tous les 2, je vous adore.

Merci à El Pepito, 4^{ème} acolyte de bio. Dommage que tu sois au Chili depuis si longtemps et pour si longtemps encore, tu nous manques trop ici !

Lydie et Pop. Lydie, je te connais depuis maintenant 13 ou 14 ans (pfou ça fait un bail). Ton petit monde dans ta tête est génial, ne le quitte jamais. Pop, dit MacHoules, ne change rien non plus. Continuons à partager les victoires du Stade et tous les petits bonheurs de la vie.

Merci à Pat et Mat, et leur nombreuse famille animale. Floriane, ou Patanem pour les intimes, toutes ces soirées passées sur les jeux vidéos avec toi, un vrai bonheur. T'inguiètes, ma grandiosité dans le jeu n'a pas fini de te mettre des raclées ! (quoi je ne suis pas modeste ? pfff je suis une vraie incomprise). Mathieu, continue ta zik, c'est toujours une joie d'écouter ton album. Un peu de pub au passage, chercher « Monsieur Mathieu », album disponible sur le net, à écouter.

Auré et Manu. Mère, malgré la distance, toujours une petite pensée pour ta fille, ça fait plaisir. Je vous adore tous les 2 aussi. Votre joie, humour, générosité, patate, comme je l'ai dit plus haut, ce sont de vraies qualités. Beke à la crotte Dundie.

Les Bronrel : Fanny et Julien. Fanny, dixit le Bisounours du Mal. Si si c'est possible ! Une vraie perle, mais à ses côtés, penser à rester sur ses gardes, un tacle est si vite arrivé ;-). Julien, ton humour est aussi sans faille, tout comme ta gentillesse.

Édith et David. Et oui Édith, tu as droit à 2 paragraphes, un dans le niveau Lab, et un dans les potes. J'te jure, c'était un accident le ventrou !!! (psst David, on se voit samedi hein ?) Plus sérieusement, vous aussi, très heureuse que vous soyez descendus dans le sud pour qu'on puisse vous connaître.

Je tiens également à dire un grand merci à Mailo et Émilie, pour toutes ses soirées passées ensemble et ces bons moments partagés, depuis au moins 10 ans maintenant. Merci aussi à Cam, à Alan (mon alcoolyste de DEA, merci!!!! alan pour ce fameux retour de soirée AlphaT) et à Benjamin pour cette folie dans ta tête (vous êtes combien là dedans?).

Enfin, merci à mes parents. Papa et Maman, merci pour votre soutien, de m'avoir permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions, et d'avoir supporté ma mauvaise humeur du réveil pendant des innombrables années. Je vous aime fort.

Merci à mon fréro, Kristov. Ton intelligence et ta réussite ont toujours été un exemple pour moi. Ta femme est merveilleuse et ta fille la 8^{ème} merveille du monde. Vous êtes une super tite famille.

Merci à mes grands-parents, Patou et Manou. Merci pour votre générosité et votre gentillesse.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	3
ABRÉVIATIONS	6
RÉSUMÉ.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCTION	9
A – LA BIOGÈNESE DES RIBOSOMES CHEZ LES MAMMIFÈRES	12
I - La transcription des gènes ribosomiques.....	12
II – Le nucléole.....	16
II.1 – Structure.....	17
II.2 – Composition et rôles du nucléole.....	19
III – Maturation des pré-ARNr et assemblage des particules pré-ribosomiques	21
III.1 – Du pré-ARNr 47S aux ARNr matures 18S, 5,8S et 28S : clivages et maturation des espaceurs transcrits chez les mammifères.....	22
- Clivages précoces dans l'ETS1 et l'ETS2 : sites 01/A', A0, 1 et 02	23
- Clivage au site 2 dans l'ITS1 : scission de la particule 90S en particules pré-40S et pré-60S	24
- Clivages au sein de la particule pré-40S : maturation de l'ITS1	25
- Clivages au sein de la particule pré-60S : maturation de l'ITS2 par coupure aux sites 3' et 4' ..	26
III.2 – Du pré-ARNr 47S aux ARNr matures 18S, 5,8S et 28S : modifications post-transcriptionnelles chez les mammifères.....	27
- Pseudouridylation	27
- 2'O-méthylation.....	28
III.3 – Composition des particules pré-ribosomiques chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	29
III.4 – Protéines ribosomiques : assemblage et implication au cours de la biogène des ribosomes chez les mammifères.....	30

III.5 – Composition des particules pré-ribosomiques au cours de leur maturation, chez les mammifères	33
- Particules 90S.....	33
- Particules pré-40S	35
- Particules pré-60S	36
III.6 – Rôles des facteurs pré-ribosomiques au cours de la maturation des ribosomes chez les mammifères	37
- Facteurs pré-ribosomiques impliqués dans la maturation de la particule ribosomique 40S	37
- Facteurs pré-ribosomiques impliqués dans la maturation de la particule ribosomique 60S	39
III.7 – Export nucléocytoplasmique des particules pré-ribosomiques	44
B – ANOMALIES DE LA MATURATION DES RIBOSOMES ET PATHOLOGIES.....	47
I – Anémie de Diamond-Blackfan (ou ADB).....	47
II – Syndrome de Schwachman-Diamond (ou SDS).....	48
III – Syndrome 5q-	49
IV – Dyskératose congénitale liée à l’X	49
V - Chondrodysplasie métaphysaire de McKusick ou hypoplasie cartilage-cheveux.....	50
VI – Syndrome de Treacher-Collins ou TCS	50
VII – Tumorigenèse et biogenèse des ribosomes	51
C – NUCLEOLE ET BIOGENÈSE DES RIBOSOMES PENDANT LA MITOSE.....	53
I – Contrôle de la transcription de l’ADNr pendant le cycle.....	53
I.1 – Inhibition de l’activité ARN pol I.....	53
I.2 – Réactivation de la transcription en fin de mitose	55
II – Quel comportement des composants nucléolaires pendant la mitose ?	56
II.1 – Désassemblage des nucléoles en début de mitose	56
II.2 – Reformation des nucléoles en sortie de mitose	58
- Foci dérivés du nucléole	59
- Corps pré-nucléolaires ou PNB	60

RÉSULTATS	64
A – L’analyse de deux facteurs pré-ribosomiques, bystine et hTsr1, souligne les différences dans l’évolution de la biogenèse des ribosomes entre levure et mammifères.	65
I – Publication	68
II – Conclusion	81
III – Résultats complémentaires.....	83
B – La dynamique des corps pré-nucléolaires en fin de mitose dépend de la reprise de la maturation des ARNr pré-ribosomiques.	84
I – Résultats	87
II – Conclusion	130
DISCUSSION et PERSPECTIVES	132
A – Évolution de la biogenèse de la petite sous-unité	133
B – Mitose et biogenèse des ribosomes	137
MATÉRIEL ET MÉTHODES	142
A – Culture cellulaire et traitement par des inhibiteurs	143
B – Plasmides	143
C – Inhibition de l’expression des gènes par des petits ARN interférants	144
D – Extraction des ARN totaux et qRT-PCR	145
E – Fractionnement sub-cellulaire	146
F - Analyse des pré-ribosomes et des polysomes par centrifugation sur gradient de saccharose	147
G – Analyse des pré-ARNr	148
H – Détection des protéines fluorescentes, hybridation <i>in situ</i> et immunofluorescence	149
I – Analyses des protéines par Western blot	151
BIBLIOGRAPHIE	153

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	ARN ribosomique
ARNm	ARN messenger
ARN pol I	ARN polymérase I
ARN pol II	ARN polymérase II
ARN pol III	ARN polymérase III
NOR	« Nucleolar Organizer Region »
GC	« Granular Component », Composant Granulaire
FC	« Fibrillar Center », Centre Fibrillaire
DFC	« Dense Fibrillar Component », Composant Fibrillaire Dense
RNP	« RiboNucleoProteic »
siARN	« Small Interference » ARN
snoARN	« Small NucleOlar » ARN
snoRNO	« Small NucleOlar » RNP
ITS	« Internal Transcribed Spacer »
ETS	« External Transcribed Spacer »
RPS	« Ribosomal Protein of the Small subunit »
RPL	« Ribosomal Protein of the Large subunit »
NES	« Nuclear Export Signal »
NLS	« Nuclear Localisation Signal »

RÉSUMÉ

Principalement étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la biogenèse des ribosomes est un processus ubiquitaire encore peu décrit chez les mammifères. Les études menées ces dernières années dans ces organismes ont décrit de nouvelles étapes de maturation des ARNr au sein des métazoaires. Les différences dans les étapes de ce processus entre homme et levure ainsi que le nombre croissant de maladies liées à des défauts de biogenèse des ribosomes soulèvent l'intérêt de l'étude de ces mécanismes dans des organismes pluricellulaires, en particulier chez l'homme.

Le but de ma thèse consistait à préciser les étapes de la maturation et de l'assemblage de petite sous-unité ribosomique, dont la production est plus simple que celle de la grande sous-unité. Pour cela, je me suis intéressée à deux orthologues humains de facteurs pré-ribosomiques de *S. cerevisiae*, Enp1p et Tsr1p, intervenant à des étapes distinctes, i.e. précoce et nucléaire pour Enp1p, et tardive et cytoplasmique pour Tsr1p. Les résultats obtenus ont montré la conservation de ces protéines en tant que facteurs pré-ribosomiques requis pour la maturation de la petite sous-unité chez l'homme. Nous avons ainsi décrit une nouvelle étape de maturation de l'ARNr 18S dans les cellules humaines, le pré-ARNr 21S-C, ainsi qu'un couplage export-maturation de la particule pré-40S spécifique à l'homme.

Lors de la perte d'expression de la bystine et de certaines protéines ribosomiques, nous avons observé de manière inattendue un défaut de résorption des corps pré-nucléolaires en sortie de mitose. Les corps pré-nucléolaires (ou PNBs) sont des structures transitoires, décrites jusque là comme des plates-formes d'assemblage pour la reformation des nucléoles. Nos résultats mettent en évidence pour la première fois que la maturation des ribosomes reprend au sein même des PNBs. Ceci nous amène à proposer que ce soit ce mécanisme qui oriente la résorption ordonnée et progressive des PNBs en début de phase G1. De manière intéressante, la perte d'expression de certaines protéines ribosomiques impliquées dans la DBA entraîne des défauts de résorption des PNBs ainsi qu'un délai dans la progression en phase G1, ce qui soulève la question de la conséquence des défauts de la réorganisation post-mitotique du noyau dans les mécanismes physiopathologiques.

L'ensemble de ces résultats mettent donc en exergue des spécificités de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères et précisent une partie des mécanismes mis en œuvre lors de la nucléogénèse post-mitotique. Ils ouvrent ainsi un nouvel axe de recherche pour explorer des liens entre des défauts de biogenèse des ribosomes et le développement de pathologies.

ABSTRACT

Mostly studied in the yeast *S. cerevisiae*, ribosome biogenesis is a ubiquitous process, which is still poorly described in mammals. Recent studies performed in these organisms have revealed new maturation steps in mammals. These differences between yeast and human pre-rRNA processing together with the increasing number of diseases linked to ribosome biogenesis defects have fueled interest for these mechanisms in pluricellular organisms, especially Human.

The objective of this thesis was to better define the mechanism underlying assembly and maturation of the small subunit, the production of which is simpler than that of the large subunit. This study was focused in two human orthologs of yeast pre-ribosomal factors, Enp1p and Tsr1p, known to be required at distinct steps of 40S particle maturation, i.e. early and nuclear step for Enp1p and late and cytoplasmic step for Tsr1p. Our results show that these two proteins have conserved functions in mammalian small subunit biogenesis compared to yeast. However, we also find differences in the coordination between the export and the maturation of the pre-40S particle, and we describe a new 18S rRNA processing intermediate in human cells, the 21S-C pre-rRNA.

After depletion of bystin or ribosomal protein, we unexpectedly observed a defect in pre-nucleolar bodies resorption at the end of the mitosis. Pre-nucleolar bodies (PNBs) are transient structures, described as assembly platforms for nucleoli reformation. Our results show for the first time that ribosome maturation is reactivated in PNBs. This leads us to propose that the ordered and progressive resorption of PNBs at the onset of the G1 phase is directed by pre-rRNA processing. Interestingly, depletion of some ribosomal proteins involved in DBA prevents resorption of PNBs and delays progression through G1 phase, which raises the issue of the possible involvement of post-mitotic nuclear organization defects in pathophysiological mechanisms.

These results highlight ribosome biogenesis specificities in mammals and define part of post-mitotic nucleologenesis mechanisms. They open new research avenues for exploring the links between ribosome biogenesis and disease.

INTRODUCTION

La biogenèse des ribosomes est un processus ubiquitaire encore peu étudié chez les mammifères, particulièrement chez l'homme. Ce processus a été plus finement décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, organisme eucaryote unicellulaire, et il est généralement considéré que les mécanismes produisant les sous-unités 40S et 60S sont conservés entre les différents organismes eucaryotes. Cependant, les études menées ces dernières années chez les mammifères ont permis de décrire des étapes supplémentaires de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) par rapport à *S. cerevisiae*. Ces différences indiquent que la conservation de ce processus entre les différents eucaryotes est limitée et soulèvent l'intérêt de l'étude de ces mécanismes dans des organismes pluricellulaires. De plus, le lien entre la biogenèse des ribosomes et des maladies génétiques appelle une étude spécifique de ce processus chez l'homme.

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit donc dans l'optique de l'analyse de la biogenèse de la sous-unité 40S dans des cellules humaines. Mon but était de caractériser et de préciser des étapes de la maturation et de l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique. La stratégie consistait à étudier la fonction d'orthologues humains de facteurs pré-ribosomiques de *S. cerevisiae*, impliqués à différents stades dans la biogenèse de la sous-unité 40S, bystine/Enp1 et Tsr1. Ces 3 facteurs sont requis pour des étapes temporellement distinctes chez la levure : Enp1p à la fois pour la maturation précoce au sein de la particule 90S et intermédiaire pour la maturation nucléaire de la particule pré-40S, tandis que Tsr1p est nécessaire pour l'étape cytoplasmique de synthèse de la particule pré-40S. Ces facteurs ainsi caractérisés nous auraient servis d'outils pour analyser la composition des particules 90S et pré-40S humaines à ces différents stades de maturation.

Les résultats obtenus ont permis de montrer la conservation de la fonction de bystine/Enp1 et de hTsr1 dans la maturation de la petite sous-unité chez l'homme. La caractérisation fonctionnelle de ces facteurs a par ailleurs mené à la description de

nouvelles différences dans la maturation de l'ARNr 18S et dans le couplage export-maturation de la particule pré-40S chez les mammifères par rapport à la levure. Cependant, l'utilisation de bystine et hTsr1 comme outil pour l'analyse de la composition protéique des particules pré-40S s'est également révélée compliquée et ne nous a pas donné de résultats satisfaisants quant à leur emploi comme appât.

D'autre part, un phénotype particulier a été observé lors de l'étude de bystin/Enp1. Suite à l'absence de cette protéine, des foci nucléoplasmiques sont observables en FISH avec une sonde révélant tous les précurseurs de l'ARNr 18S. Ce phénotype avait préalablement été mis en évidence lors de l'analyse des protéines ribosomiques de la petite sous-unité (Choesmel *et al.*, 2007; Choesmel *et al.*, 2008; Doherty *et al.*, 2010). Une analyse approfondie a révélé que ces foci correspondent à des corps pré-nucléolaires qui ne se résorbent pas en sortie de mitose en absence de ces protéines. Nos résultats ont mis en évidence pour la première fois un lien entre la reformation complète du nucléole et la maturation des pré-ARNr en fin de mitose.

Dans l'introduction de ce manuscrit, je m'attacherai à décrire dans un premier temps les différents mécanismes impliqués dans la synthèse des sous-unités ribosomiques, depuis la transcription des gènes ribosomiques au sein des nucléoles jusqu'aux dernières étapes cytoplasmiques. Dans un deuxième temps, je décrirai l'état des connaissances sur le devenir, pendant la mitose, des constituants nucléolaires et des particules pré-ribosomiques.

A – LA BIOGENÈSE DES RIBOSOMES CHEZ LES MAMMIFÈRES

La biogenèse des ribosomes mobilise une part importante de l'énergie et de l'activité cellulaires. Ce processus débute dans un domaine particulier du noyau des cellules eucaryotes, le nucléole, et se termine dans le cytoplasme où les ribosomes exerceront leur rôle dans la traduction. La synthèse et l'assemblage des protéines et des ARN ribosomiques constitutifs des ribosomes mobilisent les 3 ARN polymérase cellulaires : l'ARN polymérase I (ARN pol I) pour la synthèse des ARNr 18S, 5,8S et 28S, l'ARN polymérase III (ARN pol III) pour l'ARN 5S et l'ARN polymérase II pour les protéines ribosomiques et l'ensemble des facteurs intervenant dans l'assemblage des particules. La production des ribosomes est un processus consommateur d'énergie. Dans une cellule de levure en phase exponentielle de croissance, près de 60% de la transcription totale sont dédiés à la transcription de l'ADNr par l'ARN pol I tandis que la synthèse des protéines ribosomiques mobilise environ 50% de la transcription par l'ARN pol II et 90% de l'activité d'épissage des ARNm (Woolford, 1991).

La transcription de l'ADN ribosomique (ADNr), première étape de la biogenèse des ribosomes, produit un long précurseur polycistronique. Ce dernier comporte les futurs ARNr matures des deux sous-unités, les ARNr 18S, 5,8S et 28S. La maturation de ce précurseur se fait selon des séries de clivages ainsi que par des modifications de bases ou de nucléotides. Ces étapes de maturation s'accompagnent d'un grand dynamisme d'association et de dissociation de facteurs pré-ribosomiques aux sous-unités immatures. Ces facteurs sont des protéines impliquées dans la maturation des particules pré-ribosomiques, mais qui ne font pas partie des ribosomes matures. Les dernières étapes de maturation des sous-unités pré-40S et pré-60S s'effectuent dans le cytoplasme. L'assemblage des particules pré-ribosomiques est étroitement couplé au transport du nucléole au cytoplasme, avec une étape importante d'export nucléocytoplasmique.

I - La transcription des gènes ribosomiques

La synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) nécessite l'action de l'ARN pol I qui est uniquement dédiée à cette fonction. Chez les mammifères, chaque unité d'ADN ribosomique (ADNr) est constituée d'une séquence transcrite d'environ 14 kb et d'une

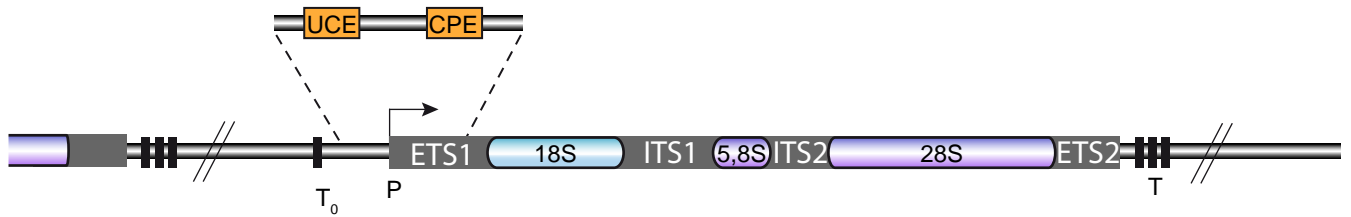
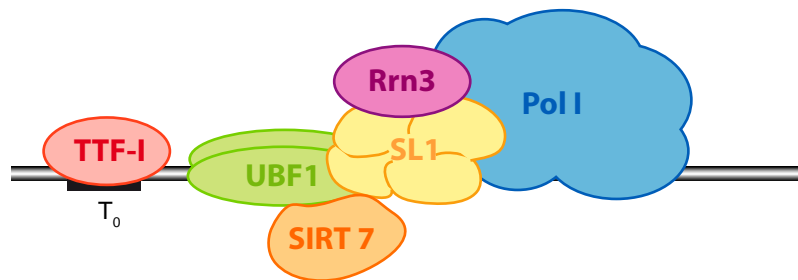
A**B**

Figure 1 : Structure des répétitions des gènes ribosomiques et composition de la machinerie de transcription de l'ARN pol I.

(A) Un gène ribosomique comprend deux séquences initiatrices en amont du site +1 de la transcription, appelés CPE et UPE. À la suite de la séquence codante, des séquences terminatrices de la transcription sont présentes, en aval du gène mais également en amont du promoteur. P = Promoteur ; CPE = "Core Promoter Element" ; UPE = "Upstream Promoter Element" ; T₀ = Élément de terminaison de la transcription en amont du promoteur ; T = Éléments de terminaison de la transcription en 3' de la région transcrite de l'ADNr. (B) Le complexe d'initiation de la transcription est constitué de l'ARN pol I, d'un dimère UBF, et des facteurs SIRT7, SL1 et Rrn3. TTF-I est une protéine requise pour la terminaison de la transcription par l'ARN pol I.

longue séquence intergénique (ou IGS pour « InterGenic Sequence ») d'environ 30 kb. La transcription d'un gène ribosomique produit un long précurseur polycistronique de 47S, dans lequel se trouvent le futur ARNr mature 18S, constitutif de la petite sous-unité 40S, et les futurs ARNr 5,8S et 28S, composants de la grande sous-unité 60S (Figure 1A). Le 3^{ème} ARNr de la grande sous-unité, l'ARNr 5S, est, quant à lui, synthétisé par l'ARN pol III. Cet ARNr est produit dans le noyau mais hors du nucléole. Il forme un complexe ribonucléoprotéique, appelé RNP 7S, avec la protéine TFIIIA. Cette RNP est exportée dans le cytoplasme où TFIIIA est échangé avec une protéine ribosomique de la grande sous-unité, RPL5. Le complexe ARNr 5S/RPL5 est ensuite réimporté dans le noyau et est incorporé à la particule pré-60S (Rudt and Pieler, 1996).

L'ARN pol I est un large complexe enzymatique d'environ 500 à 600 kDa, composé d'au moins 14 sous-unités et de 2 ou 3 facteurs associés ou PAF (pour « Polymerase Associated Factor ») (Figure 1B) (Hanada *et al.*, 1996; Hannan *et al.*, 1998). Cinq des sous-unités de l'ARN pol I sont communes à toutes les ARN polymérases, 2 sont partagées avec l'ARN pol III et 6 sous-unités lui sont spécifiques¹ (Panov *et al.*, 2006; Reeder, 1999). La spécificité de liaison au promoteur de l'ARN pol I est conférée par le complexe SL1 (TIFIB chez la souris). Ce complexe multiprotéique contient TBP (pour « TATA-box Binding Protein »), un facteur de transcription commun aux 3 ARN polymérase, auquel sont associés 5 facteurs, nommés TAF_I (pour « TBP-Associated Factors of RNA pol I »)².

L'initiation de la transcription nécessite un facteur particulier, UBF1 (Upstream

¹ : Sous-unités communes aux 3 ARN pol : hRBP5, hRBP6, hRBP8, hRBP10 et hRBP12

Sous-unités communes aux ARN pol I et II : hRPA19 et hRPA40

Sous-unités spécifiques à l'ARN pol I : hRPA12.2, hRPA43, hRPA49, hRPA135, hRPA190 et CAST

² : TAF_I12 (Denissov *et al.*, 2007), TAF_I41 (Gorski *et al.*, 2007), TAF_I48 (Heix *et al.*, 1997; Zomerdijk *et al.*, 1994), TAF_I68 (Cavanaugh *et al.*, 2008; Comai *et al.*, 1994; Heix *et al.*, 1997; Zomerdijk *et al.*, 1994) et TAF_I110 (Heix *et al.*, 1997; Zomerdijk *et al.*, 1994)

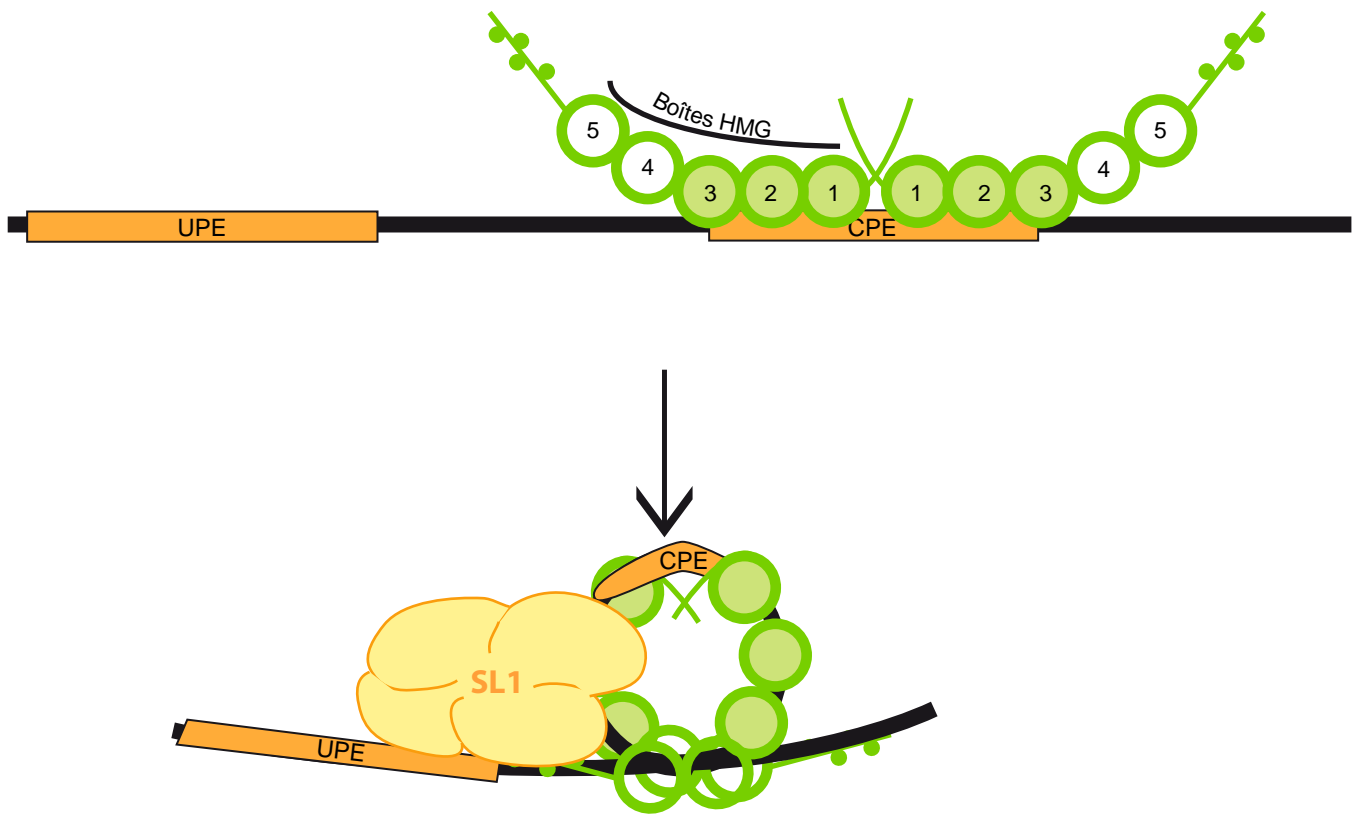


Figure 2 : "Enhancesome" : remodelage de la région promotrice de l'ADNr par l'interaction avec UBF.

Un dimère d'UBF s'associe au promoteur de l'ADNr via ses motifs HMG. Cette liaison entraîne la courbure de la région promotrice, formant ainsi un complexe appelé "enhancesome". Cette structure permet le rapprochement des régions contenant l'UPE et le CPE et le recrutement de SL1 pour former le complexe de pré-initiation.

Adapté de Stefanovsky et al., 2001

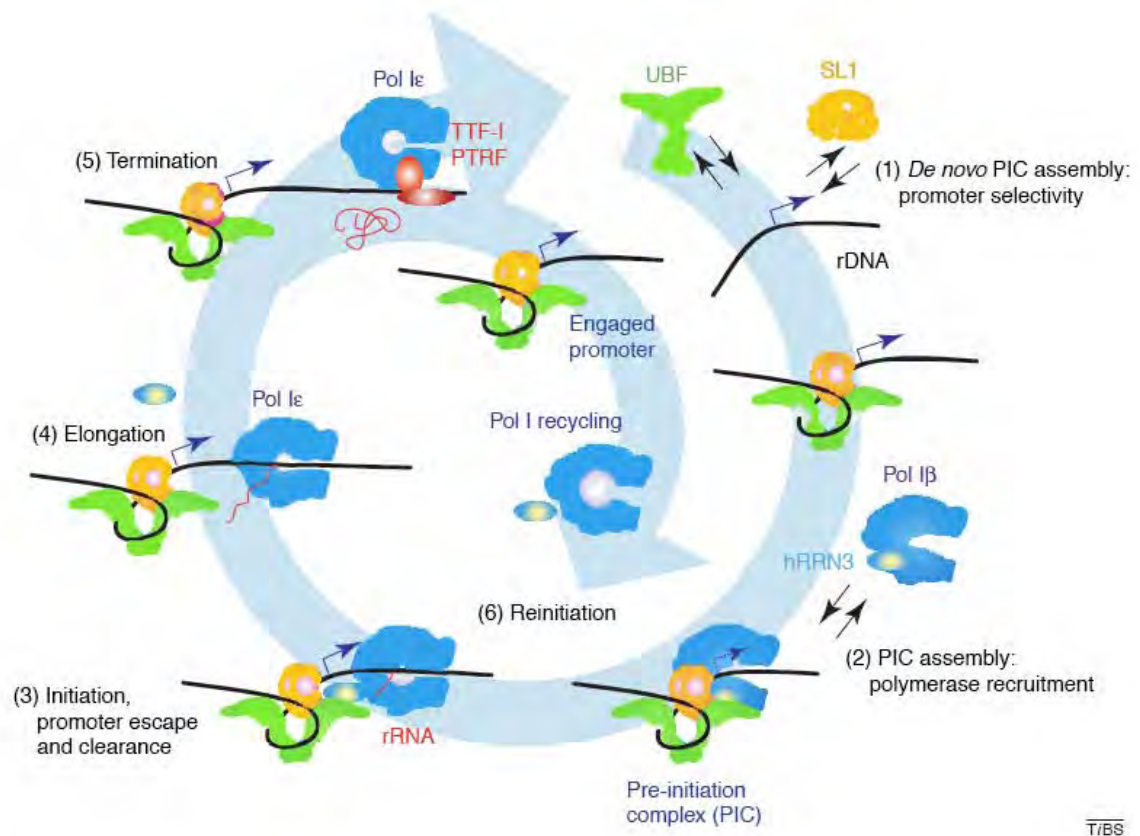


Figure 3 : Cycle de transcription par l'ARN polymérase I.

UBF sous forme dimérisée interagit avec le promoteur, créant la courbure de cette région. La fixation de SL1 permet la stabilisation de cette structure sur laquelle est recrutée l'ARN pol I et Rrn3. UBF, SL1, Rrn3 et l'ARN pol I forment le complexe d'initiation de la transcription. L'ARN pol I est ensuite activée et synthétise l'ARNr. La terminaison de la transcription se fait en 3' du gène, sur des séquences spécifiques sur lesquelles se lie le facteur de terminaison de la transcription, TTF-I. Le long précurseur polycistronique est alors libéré du complexe de transcription. D'après Russel et al, 2005

Binding Factor 1). Cette protéine appartient à la famille HMGB et présente la particularité de contenir 6 motifs HMG chez l'homme et 5 chez le xénope. Ces motifs se fixent au petit sillon de l'hélice d'ADN avec une faible affinité. Une deuxième isoforme, UBF2, issue d'un épissage alternatif, est présente en quantité équivalente à UBF1 dans les cellules (O'Mahony and Rothblum, 1991). Chez l'homme, UBF2 comporte une délétion de 37 acides aminés qui affecte en partie le deuxième motif HMG, ce qui la rend transcriptionnellement inactive. L'homo- ou hétéro-dimérisation de ce facteur est essentielle non seulement pour son interaction au niveau du promoteur du gène ribosomique, mais également pour sa liaison aux gènes d'ADNr. Ces protéines jouent donc un rôle majeur sur le plan fonctionnel au niveau transcriptionnel et elles sont également impliquées dans l'organisation structurale des gènes ribosomiques (Mais *et al.*, 2005).

UBF1 se fixe sur une séquence particulière du promoteur, le CPE (pour Core Promoter Element) (Bell *et al.*, 1990). La liaison d'un dimère d'UBF1 à l'ADN entraîne la courbure de la région promotrice, formant ainsi un complexe appelé « enhancesome » (Figure 2) (Bazett-Jones *et al.*, 1994; Leblanc *et al.*, 1993; Stefanovsky *et al.*, 2001). La formation de cette structure induit le rapprochement des régions contenant l'UPE et le CPE (Learned *et al.*, 1986; Schnapp and Grummt, 1991), ce qui permettrait ensuite le recrutement de SL1 et la formation d'un complexe de pré-initiation (Figure 2 et 3). Cet enchaînement d'événements a été remis en cause par Friedrich *et al.*, 2005, qui ont démontré que la formation du complexe de pré-initiation dépendait de la fixation initiale de SL1 sur la région promotrice, qui est intrinsèquement courbée (Schroth *et al.*, 1992). Une fois cette structure formée et stabilisée par UBF1, l'ARN pol I est recrutée grâce au facteur Rrn3 (TIF-IA chez la souris), qui est transitoirement associée à l'ARN pol I (Figure 3). La présence de Rrn3 n'est pas essentielle pour la fixation de l'ARN pol I au promoteur des gènes ribosomiques mais elle est requise pour l'activation du complexe et donc pour la synthèse des ARNr (Cavanaugh *et al.*, 2008).

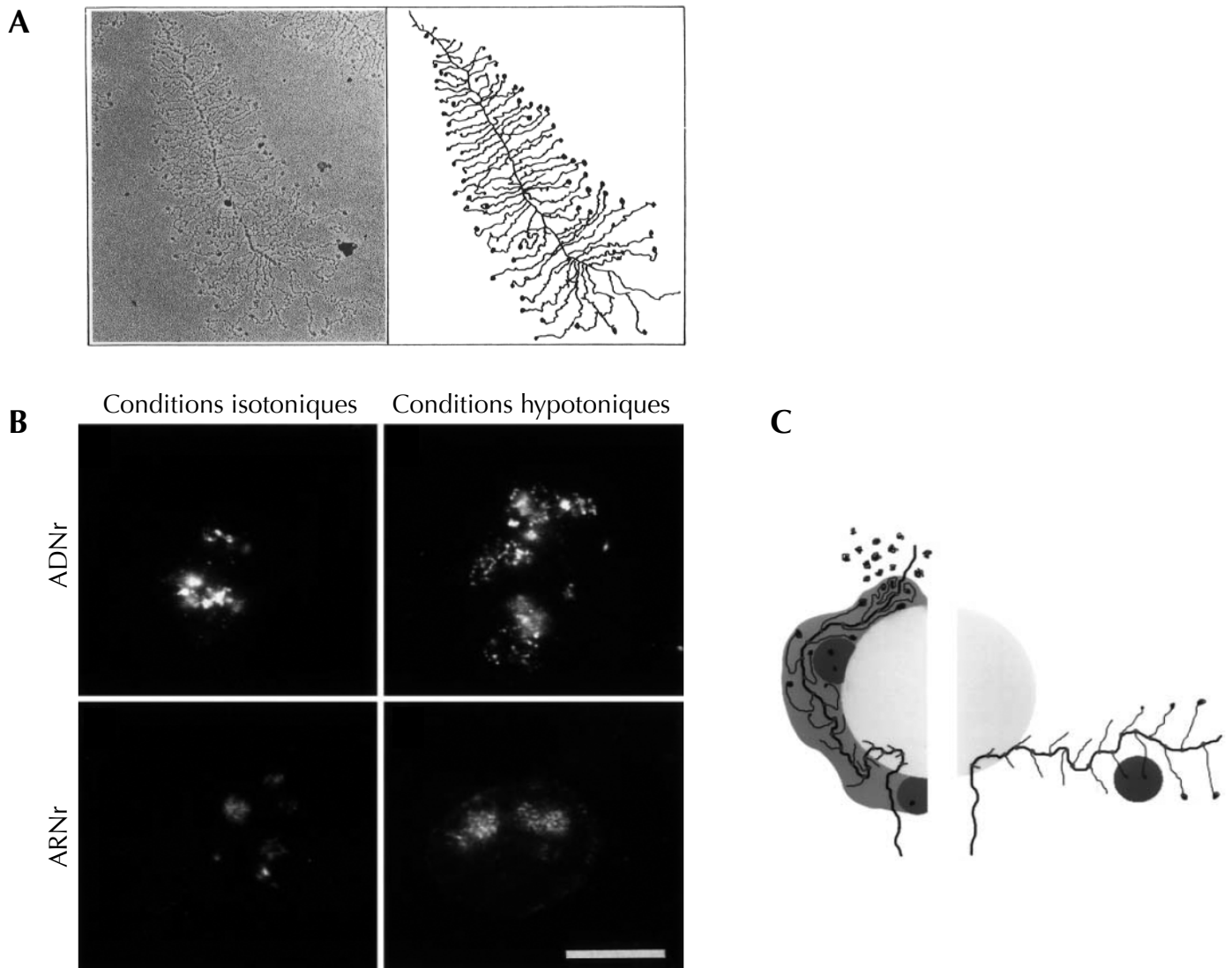


Figure 4 : Visualisation de la structure en "arbre de Noël" de l'ADNr et des transcrits primaires de xénope ou de cellules HeLa.

(A) Observation en microscopie électronique d'une unité de transcription d'un gène d'ADNr, par étalement de chromatine. Cette structure a été décrite comme un "arbre de Noël", l'ADNr sur lequel se succèdent les complexes transcriptionnels de l'ARN pol I constituant le tronc. Les ARNr en cours d'élongation forment les branches. Leur taille est d'autant plus longue que l'ARN pol I est plus distante du promoteur. D'après Mougey et al., 1993

(B) Hybridation *in situ* en fluorescence avec une sonde révélant l'ADNr (panneaux du haut) ou les précurseurs précoces des ARNr (panneaux du bas). Les observations ont été réalisées en conditions isotoniques (panneaux de gauche) ou en conditions hypotoniques (panneaux de droite). Barre d'échelle = 10 μ m

(C) Représentation schématique du modèle en "arbre de Noël" de la transcription dans les nucléoles de cellules humaines. En conditions isotoniques (à gauche), le FC (en gris clair) est entouré par le DFC (en gris foncé), qui contient les ADNr en cours de transcriptions et les transcrits primaires. En conditions hypotonique (à droite), le nucléole est déstructuré, permettant l'étalement du gène d'ADNr en cours de transcription et donc de visualiser la structure en "arbre de Noël" *in situ*. D'après Mosgoeller et al., 2001.

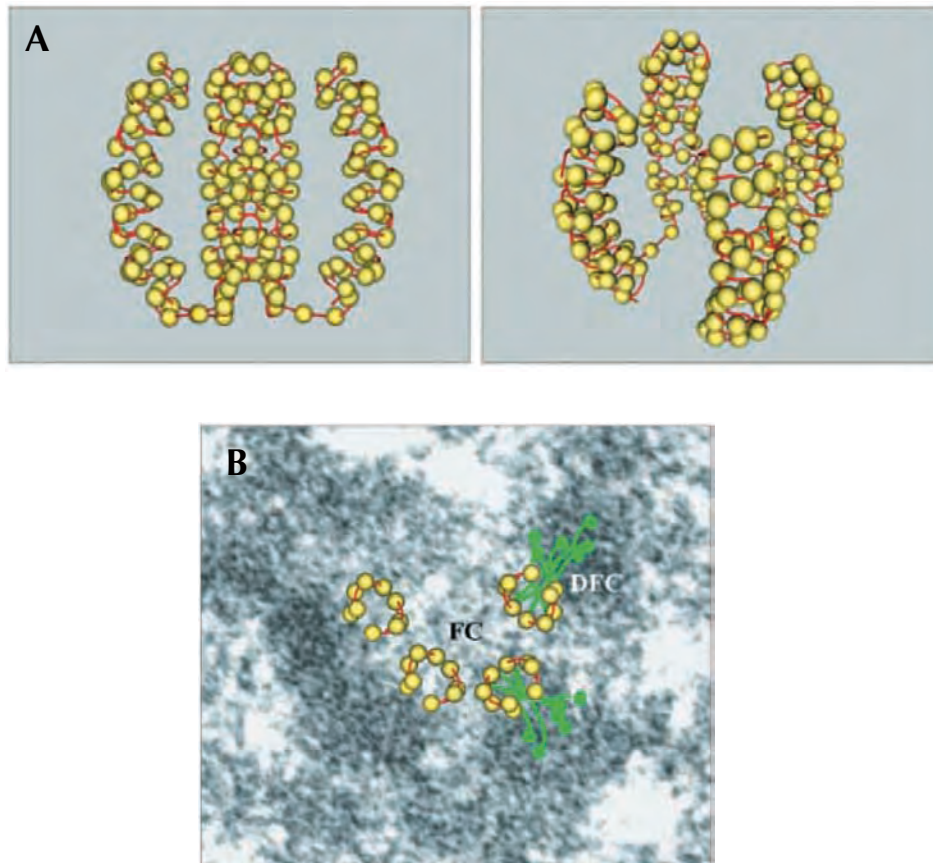


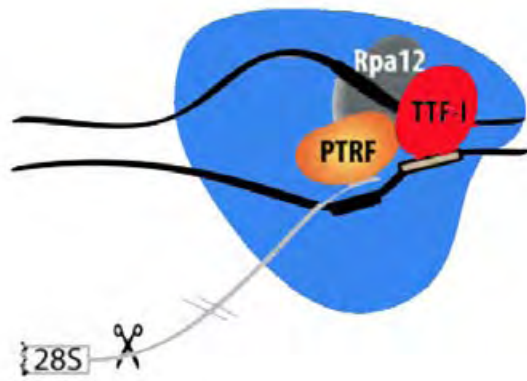
Figure 5 : Modèle de l'organisation 3D des gènes ribosomiques dans un FC.

(A) Le gène d'ADNr est replié en 4 boucles . Les boules jaunes représentent les complexes d'ARN pol I en cours de transcription. À gauche, vue de profil; à droite, vue en perspective. (B) Superposition d'une coupe de ce modèle sur l'image d'une coupe ultrafine de nucléole obtenue en microscopie électronique. Les boucles d'ADNr apparaissent comme des anneaux ouverts, desquelles émergent les pré-ARNr néo-transcrits.

D'après Cheutin et al., 2002

Une fois la transcription initiée, l'élongation nécessite le relargage de TIF-IA/Rrn3 via la phosphorylation de ce facteur par la protéine kinase CK2 (Bierhoff *et al.*, 2008). CK2 régule la transcription à de multiples niveaux, de l'assemblage du complexe d'initiation à la réinitiation de la transcription par l'ARN polymérase I, par des phosphorylations de TIF-IA, TFIC et du facteur C* (Brun *et al.*, 1994; Cavanaugh and Thompson, 1985). Les gènes d'ADNr sont très activement transcrits, comme en témoigne le nombre élevé de polymérases présentes sur les gènes ribosomiques et les pré-ARNr en cours de synthèse qui en émergent. Ceci a été observé grâce à des étalements de chromatine d'ovocytes de xénope, et ces gènes en cours de transcription ont été décrits comme des structures en « arbres de Noël » (Miller and Beatty, 1969) (Figure 4A). Cet arrangement des gènes ribosomiques et des pré-ARNr en arbre de Noël est également retrouvé par des techniques d'hybridation *in situ* (FISH, Fluorescence *in situ* Hybridization) avec des sondes d'ADN et d'ARN lorsque des cellules humaines en culture sont placées dans des conditions hypotoniques (Figure 4B et 4C) (Mosgoeller *et al.*, 2001; Mougey *et al.*, 1993). L'organisation 3D des gènes ribosomiques en cours de traduction au sein des FC a été étudiée *in situ* par tomographie en microscopie électronique (Cheutin *et al.*, 2002). Cette étude révèle que l'ARN pol I se localiserait au niveau du cortex du FC. Les répétitions d'ADNr s'organiseraient en 3 à 5 boucles au sein du FC, et les pré-ARNr en cours de synthèse se situeraient à la fois dans le FC et le DFC (Figure 5) (Cheutin *et al.*, 2002).

La terminaison de la transcription s'effectue grâce à des séquences particulières situées dans l'espaceur 3' des gènes ribosomiques. Cette séquence, composée de 18 pb (AGGTCGACCAGA_{TT}ANTCCG) chez les rongeurs et de 11 pb chez l'Homme (GGGTCGACCAG) est appelée boîte Sal (Evers and Grummt, 1995; Pfeleiderer *et al.*, 1990). La fixation sur cette séquence du facteur TTF-I (pour Terminaison Transcription Factor for Pol I) représente un signal de terminaison de la transcription pour l'ARN pol I (Evers and Grummt, 1995). Une autre séquence située en amont de la boîte Sal est nécessaire pour la



□ Boîte Sal

■ Élément de libération du transcrit (Transcript Release Element)

Figure 6 : Terminaison de la transcription par l'ARN pol I.

En fin d'élongation, le complexe de transcription atteint une séquence particulière sur laquelle est fixée TTF-I. Ce facteur induit un signal de terminaison de la transcription et PTRF s'associe au complexe ARN pol I / TTF-I, ce qui stimule la libération du transcrit.
D'après Richard et al., 2009

terminaison de la transcription en agissant sur la libération des transcrits (Figure 6). Cette séquence riche en T entraînerait lors de la transcription la formation d'hétéroduplexes A-U qui déstabiliseraient l'ARN pol I en pause au niveau de la boîte Sal (Lang and Reeder, 1995). Un facteur de relargage des transcrits, PTRF (pour « Pol I and Transcript Release Eactor »), s'associe avec le complexe TTF-I/ARN pol I. Ce complexe PTRF/TTF-I/poll serait suffisant pour induire le relargage des transcrits *in vitro* (Jansa and Grummt, 1999; Jansa *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 1997).

II – Le nucléole

Les nucléoles sont les sites où sont séquestrées les copies des gènes ribosomiques et où se déroulent la synthèse du précurseur des ARNr, ses modifications, sa maturation et son assemblage aux protéines ribosomiques au sein de complexes ribonucléoprotéiques.

Le nucléole a été décrit pour la première fois au XVIII^{ème} siècle par Fontana comme « un corps oviforme ayant une tâche en son milieu ». Un demi-siècle plus tard, Montgomery et Valentin introduisirent le terme de nucléole pour définir ce domaine dans une revue de cytologie. Au début du XX^{ème} siècle, Heitz et McClintock décrivent le lien entre la structure du nucléole et les constriction secondaires de certaines paires de chromosomes, qu'ils appelèrent « Nucleolus Organizer Region » (ou NOR). Les évolutions des techniques de microscopie et notamment l'invention de la microscopie électronique au cours du XX^{ème} siècle permirent de décrire l'ultrastructure du nucléole et de le définir comme un sous-domaine nucléaire. Ce n'est qu'une cinquantaine d'années plus tard qu'un lien structure-fonction a été décrit pour ces domaines, via des expériences de coloration à l'argent permettant de révéler des protéines argyrophiles, qui étaient connues comme étant associées aux gènes d'ADNr (Goodpasture and Bloom, 1975).

Pendant un quart de siècle, de nombreuses études se sont attachées à mieux comprendre la biogenèse des ribosomes et à décrypter les relations structure-fonction des protéines, acides nucléiques et complexes ribonucléoprotéiques intervenant dans la maturation des ARNr. Plus récemment, l'étude de la composition protéique du nucléole a permis de mettre en évidence des

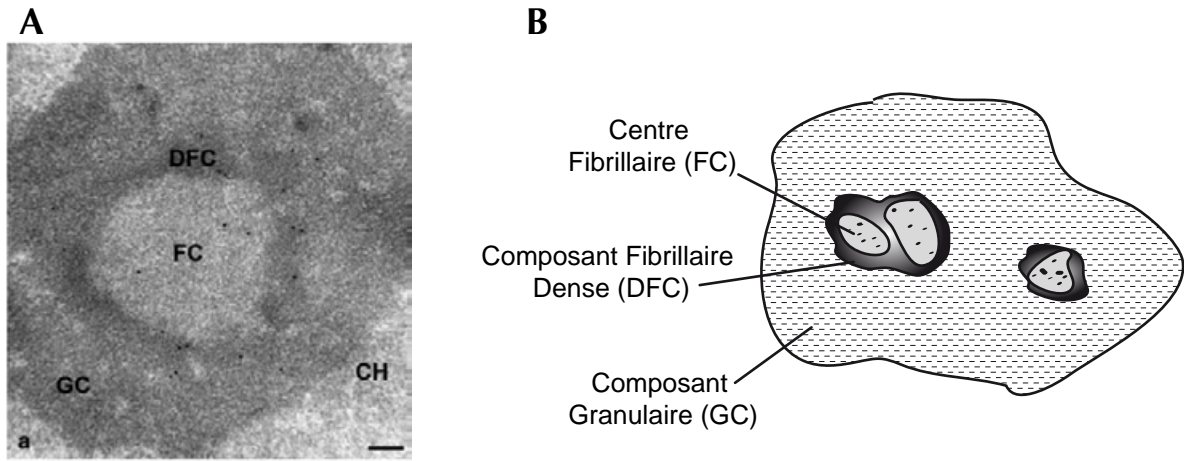


Figure 7 : Observation de l'ultrastructure d'un nucléole de cellule HeLa en microscopie électronique et représentation schématique des domaines nucléolaires.

(A) Structure du nucléole en microscopie électronique. Sur cette coupe ultrafine, un centre fibrillaire (FC), peu dense aux électrons, occupe une position centrale au sein du nucléole. Il est entouré de 2 zones concentriques, denses aux électrons, le composé fibrillaire dense (DFC) et le composé granulaire (GC). Barre d'échelle = 0,2 μm (B) Représentation schématique d'un nucléole.

D'après Thiry et al., 2009.

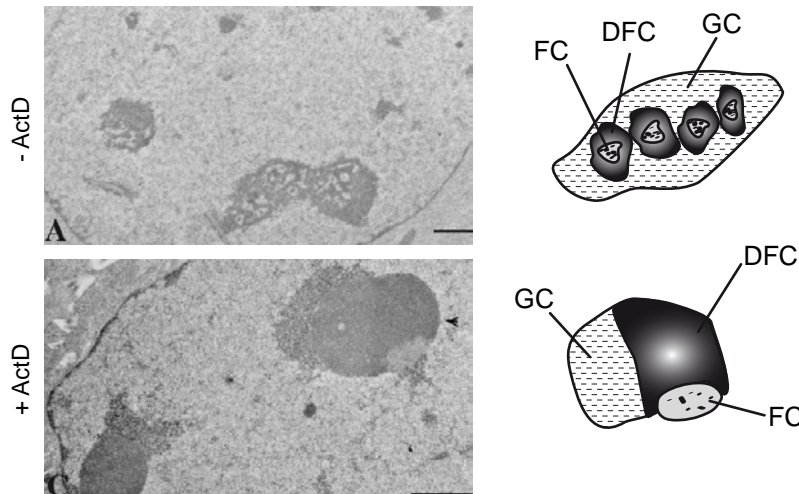


Figure 8 : Ségrégation des composants nucléolaires : observation en ME de cellules HeLa témoins ou traitées par l'ActD.

En présence d'actinomycine D, la transcription par l'ARN pol I est inhibée. Les différents domaines nucléolaires se juxtaposent, pour conduire progressivement, après 2 à 4 heures de traitement, à une structure ségrégée des différents domaines. Barre d'échelle = 1 μm

D'après Dousset et al., 2000.

fonctions « extra-ribosomiques » du nucléole, notamment par la présence de protéine impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la réponse aux stress (Andersen *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2005; Coute *et al.*, 2006; Scherl *et al.*, 2002).

II.1 – Structure

Le nucléole est un domaine particulier du noyau, non délimité par une membrane et organisé en trois sous-domaines chez les mammifères (Thiry and Lafontaine, 2005). Ces sous-domaines structuraux sont également des sous-domaines fonctionnels du fait de la différence de leur composition en protéines et en acides nucléiques. Les centres fibrillaires (FC pour Fibrillar Center), zones de faible densité aux électrons, sont entourés par une région fibrillaire très dense aux électrons, le composé fibrillaire dense (DFC pour Dense Fibrillar Component) qui alterne avec des mottes de chromatine condensée. Le reste du nucléole est occupé par le composé granulaire (GC pour Granular Component) (Figure 7) (Thiry *et al.*, 2000). Le nucléole résulte d'un équilibre entre le niveau de synthèse des ARNr, l'efficacité de maturation des particules pré-ribosomiques et l'export nucléo-cytoplasmique de ces particules ribosomiques encore immatures. La structure du nucléole est donc intimement liée à la biogenèse des ribosomes. Une cellule humaine diploïde contient environ 400 gènes ribosomiques répétés en tandem. Les loci de ces gènes ribosomiques sont localisés au niveau des régions sous-télomériques des cinq chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22 (Raska, 2004). La transcription des gènes ribosomiques peut être inhibée par un traitement avec de faibles doses d'actinomycine D (ActD). En effet, les gènes d'ADNr sont riches en GC et présentent une structure plus ouverte, ce qui les rend plus sensible à cet inhibiteur que les gènes transcrits par l'ARN pol II ou l'ARN pol III. L'inhibition de l'ARN pol I par l'ActD conduit à la ségrégation nucléolaire, menant à une séparation claire des centres fibrillaires, du composé fibrillaire dense et du composé granulaire (Figure 8) (Schofer *et al.*,

1996). Ces expériences montrent que l'organisation nucléolaire est dynamique et qu'elle est modulée en fonction de l'activité transcriptionnelle de l'ARN pol I.

Le FC, le DFC et le GC sont des sous-domaines nucléolaires définis par leur morphologie en ME, qui présentent également des fonctions différentes. En effet, une fois la transcription commencée, la biogenèse des ribosomes est un processus vectoriel, c'est-à-dire qu'elle est organisée de manière centrifuge à partir du FC. Le lieu exact de la transcription des gènes ribosomiques reste encore un sujet de controverse. Certaines études situent ce processus au niveau des FCs (Thiry *et al.*, 2000) alors que d'autres considèrent que les FCs sont des lieux de stockage des gènes ribosomiques inactifs et que la synthèse des pré-ARNr se fait à la jonction FC/DFC (Derenzini *et al.*, 2006; Koberna *et al.*, 2002; Raska *et al.*, 2006). Néanmoins, la machinerie de transcription ainsi que ses co-facteurs se localisant au sein du FC, la transcription des gènes ribosomiques semble plutôt avoir lieu au sein du FC. Les premières étapes de la maturation des pré-ARNr a lieu au niveau du DFC, puis dans le GC (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1995). Le DFC semble lui aussi présenter des variations dans sa composition selon la distance au FC. En effet, la zone du DFC la plus proche du FC est la seule à contenir l'ETS2, qui est rapidement excisé à la fin de la transcription (Gurney, 1985; Labhart and Reeder, 1990; Thiry *et al.*, 2000). Dans des cellules HeLa, la zone du DFC contenant l'ETS1 est quant à elle plus étendue que celle comprenant l'ETS2. La taille de l'ETS1 est 10 fois plus grande que celle de l'ETS2 (3658 nucléotides pour l'ETS1 contre 352 nucléotides pour l'ETS2) et la maturation de cet espaceur nécessite 3 étapes de clivages, contre un seul clivage pour éliminer l'ETS2 (Thiry *et al.*, 2000). En effet, le composant granulaire est enrichi en snoRNP U3, qui est essentielle pour les étapes précoces de la maturation ribosomique (Kass *et al.*, 1990; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991).

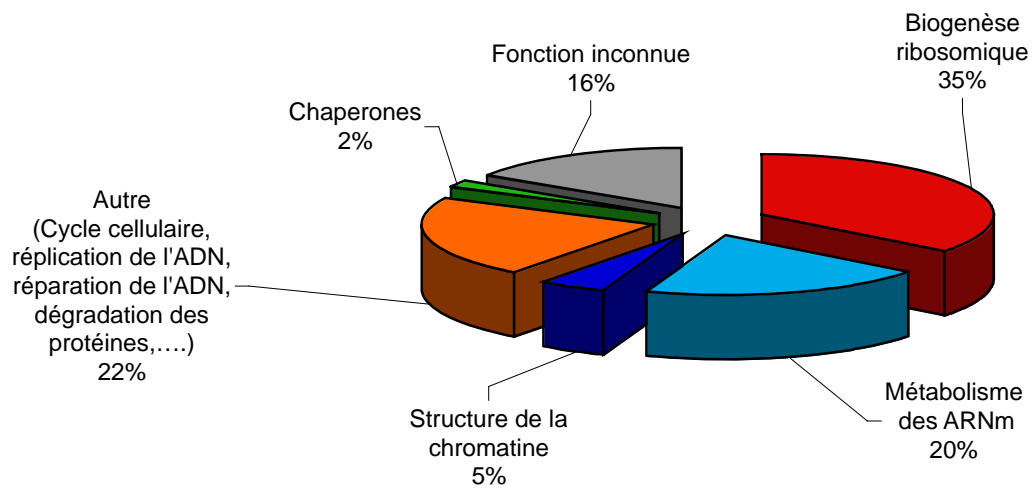


Figure 9 : Composition protéique du nucléole en fonction du rôle des protéines.

Le nucléole est composé d'environ 700 protéines. Elles ont été classifiées selon le processus dans lequel elles interviennent ou seraient potentiellement impliquées.

Adapté de Couté et al., 2006.

II.2 – Composition et rôles du nucléole

Le nucléole est composé d'une part d'acides nucléiques tels que les gènes ribosomiques, les précurseurs des ARNr et les snoARN (small nucleolar ARN, intervenant dans la maturation des particules ribosomiques), et d'autre part de protéines impliquées dans différents processus cellulaires. Les études de protéomique menées ces huit dernières années ont révélé la présence de plus de 700 protéines différentes dans le nucléole (Andersen *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2005; Scherl *et al.*, 2002). Seulement 35% des protéines du nucléole sont impliquées directement dans la biogenèse des ribosomes. Quinze pourcents des protéines nucléolaires sont impliquées dans le métabolisme des ARNm tandis que le reste des protéines présente des fonctions variées comme des chaperones, des kinases, des phosphatases ou sont impliquées dans la mitose et la régulation du cycle cellulaire (Figure 9). La variété de la composition protéique du nucléole et la nature des protéines qu'il contient révèlent que ce domaine peut non seulement s'adapter à l'état physiologique de la cellule mais qu'il peut également jouer un rôle central dans certains processus tels que la régulation du cycle cellulaire (Coute *et al.*, 2006). Ces études ont également montré la présence transitoire de certaines protéines dans les nucléoles. Ainsi, des acteurs jouant un rôle spécifique lors de la mitose sont séquestrés dans le nucléole pour être libérés seulement lors de la phase à laquelle ils interviennent. C'est le cas de la phosphatase Cdc14 qui est retenue dans le nucléole par son interaction avec la protéine Net1/Cfi1 de la phase G1 jusqu'en métaphase. Le rôle de Net1/Cfi1 dans la régulation de la transcription pol I est à l'origine de la localisation nucléolaire et serait donc la cause de la séquestration nucléolaire de Cdc14 de la phase G1 à la métaphase (Shou *et al.*, 2001). En début d'anaphase, la protéine Net1/Cfi1 est phosphorylée, ce qui entraîne une perte d'interaction avec Cdc14, qui peut alors sortir du nucléole (Azzam *et al.*, 2004; Shou *et al.*, 1999). Cdc14 peut alors inhiber les kinases cycline-dépendantes et ainsi donner le signal de sortie de mitose (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 1999).

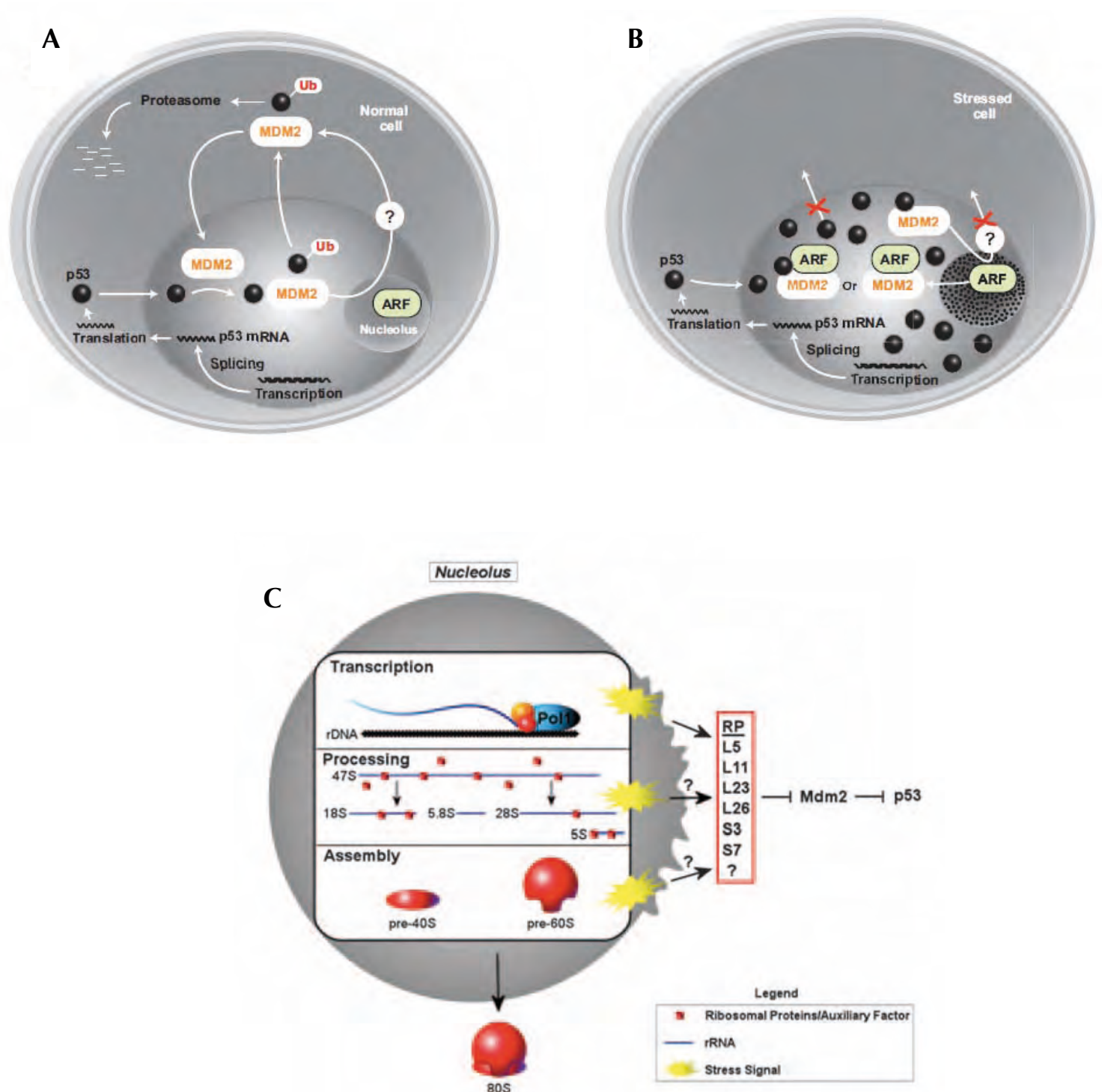


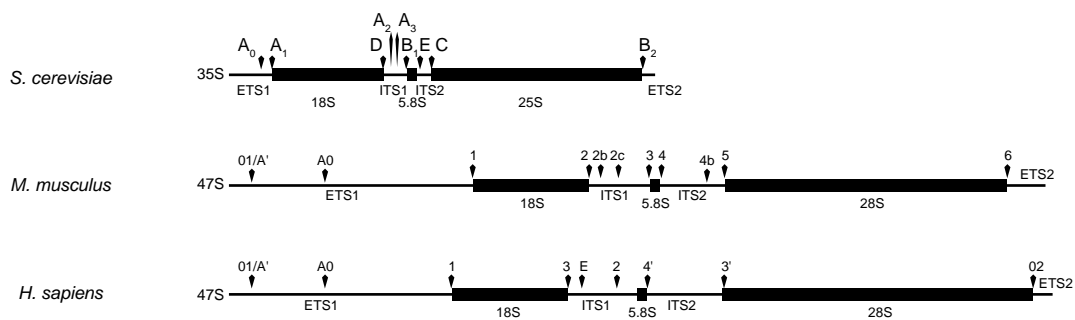
Figure 10 : Rôle du nucléole dans la stabilisation de p53 en conditions de stress

(A) En conditions physiologiques, le niveau de p53 est maintenu à de faibles doses grâce à MDM2, qui l'ubiquitine, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. (B) En conditions de stress, le nucléole est désorganisé et ARF est délocalisé du nucléole dans le nucléoplasme. ARF s'associe à MDM2 et inhibe son activité d'ubiquitinylation. p53 n'est donc plus dégradé et peut alors jouer son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. (C) Des perturbations de la biogenèse des ribosomes active la voie p53. Certaines protéines ribosomiques (RPL5, RPL11, RPL23, RPL26, RPS3 ou RPS7) sont connues pour leur implication dans la transduction des signaux de stress nucléolaires à la voie p53. Ces stress nucléolaires peuvent provenir de défauts à différents niveaux de la biogenèse des ribosomes : lors de la transcription des gènes ribosomiques, de la maturation des pré-ARNr ou suite à des défauts d'assemblage des sous-unités ribosomiques.

D'après Olson et al., 2004; Deisenroth et al., 2010

Désormais les nucléoles apparaissent également comme des territoires capables d'évaluer et de répondre à de nombreux stress cellulaires, comme les dommages d'ADN, les chocs thermiques ou l'hypoxie (Olson, 2004). Certaines perturbations de la biogenèse des ribosomes peuvent elles aussi induire un stress, qualifié de stress ribosomique ou nucléolaire, qui entraîne une réponse dont les mécanismes commencent à être décryptés. Ainsi, 3 protéines ribosomiques associées à la sous-unité 60S (RPL5, RPL11, RPL23) peuvent inhiber l'E3 ubiquitine ligase MDM2, ce qui stabilise p53 et stimule son activité (Figure 10) (Dai *et al.*, 2004; Horn and Vousden, 2008; Zhang *et al.*, 2003). D'autres protéines nucléolaires peuvent également être médiatrices de la réponse au stress ribosomique. C'est le cas de la nucléophosmine, un co-activateur essentiel de Miz1, lui-même régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Wanzel *et al.*, 2008). Plusieurs exemples dans des modèles animaux indiquent l'importance physiologique de ces mécanismes. Il a été montré récemment chez le poisson-zèbre que le gène responsable d'une neuropathie génétique (POAG) était impliqué dans la maturation de l'ARN 18S et qu'il interagissait avec la voie de réponse au stress via p53 (Skarie and Link, 2008). Même si les liens avec la voie p53 ne sont pas toujours clairement établis, un stress ribosomique peut être induit par l'haplo-insuffisance d'une protéine ribosomique, une situation rencontrée dans le cas de maladies humaines (syndrome 5q-, anémie de Diamond-Blackfan).

Au cours de la dernière décennie, la mise en cause dans plusieurs pathologies humaines d'un nombre croissant d'acteurs de la biogenèse ribosomique a renforcé l'intérêt d'une connaissance approfondie de ce processus chez l'homme (cf. chapitre B). L'apparition de symptômes différents selon la ribosomopathie soulève la question de la spécificité des mécanismes menant à ces affections suivant le défaut de ribosome. La compréhension des mécanismes conduisant à ces stress ribosomiques, et par conséquent à ses effets spécifiques selon le type cellulaire touché, est une voie d'étude intéressante et importante afin de décrypter les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies.

A**B**

Espèce	5'ETS	18S	ITS1	5,8S	ITS2	28S	3'ETS	Total
Levure	696	1801	362	158	234	3393	210	6854
Xenope	712	1826	557	162	262	4115	235	7869
Souris	4006	1871	999	157	1089	4712	565	13399
Humain	3658	1869	1095	157	1155	5035	352	13321

Figure 11 : Taille des différentes régions du long précurseur polycistronique des ARNr chez différentes espèces.

(A) Comparaison des précurseurs polycistroniques de levure, souris et homme. Ils sont dessinés à l'échelle selon la taille de chaque séquence d'ARNr. (B) D'après Klootwijk et al., 1989 pour la levure *S. cerevisiae*; Ajuh et al., 1991 pour le xénope *Xenopus laevis*; Bourbon et al., 1988 pour la souris *Mus musculus*; Gonzales et al., 1990 pour l'homme.

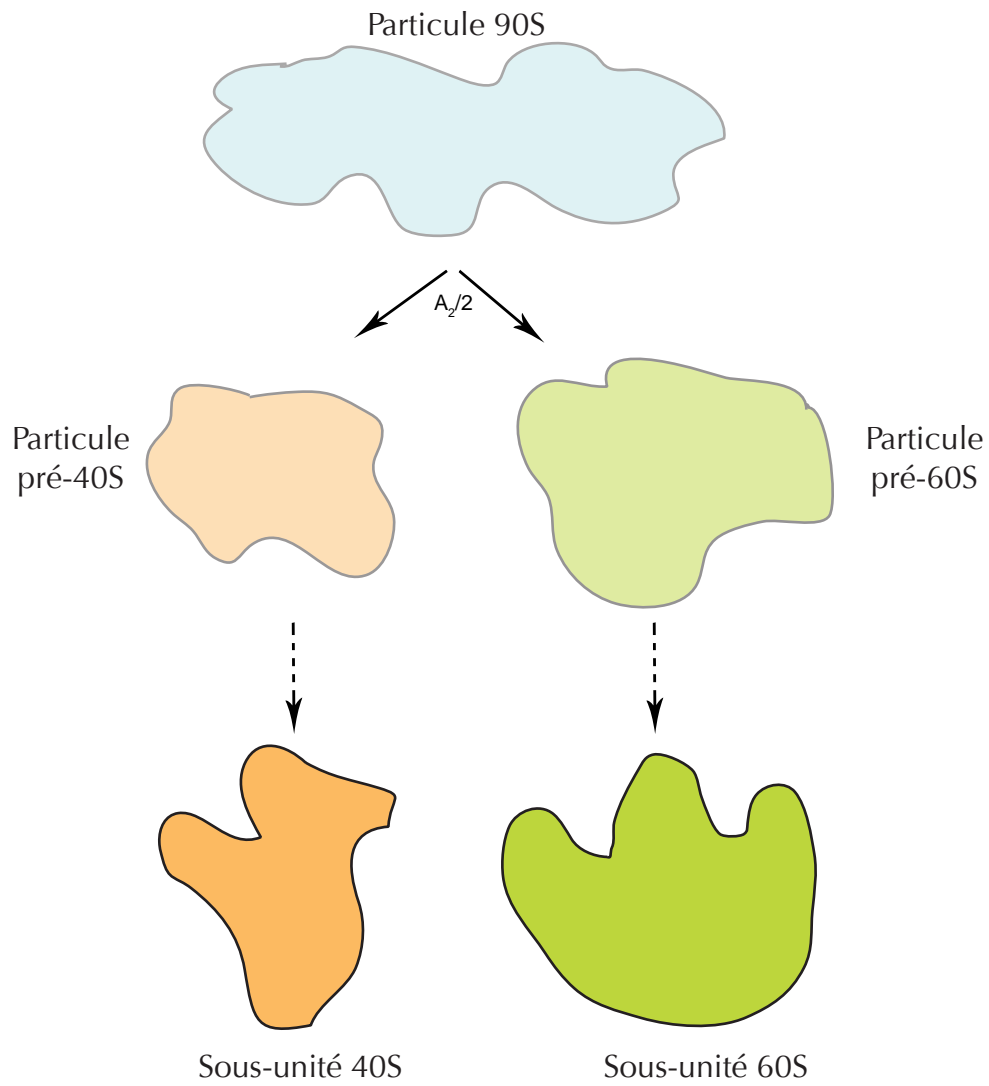


Figure 12 : Séparation de la particule 90S en particules pré-40S et pré-60S.

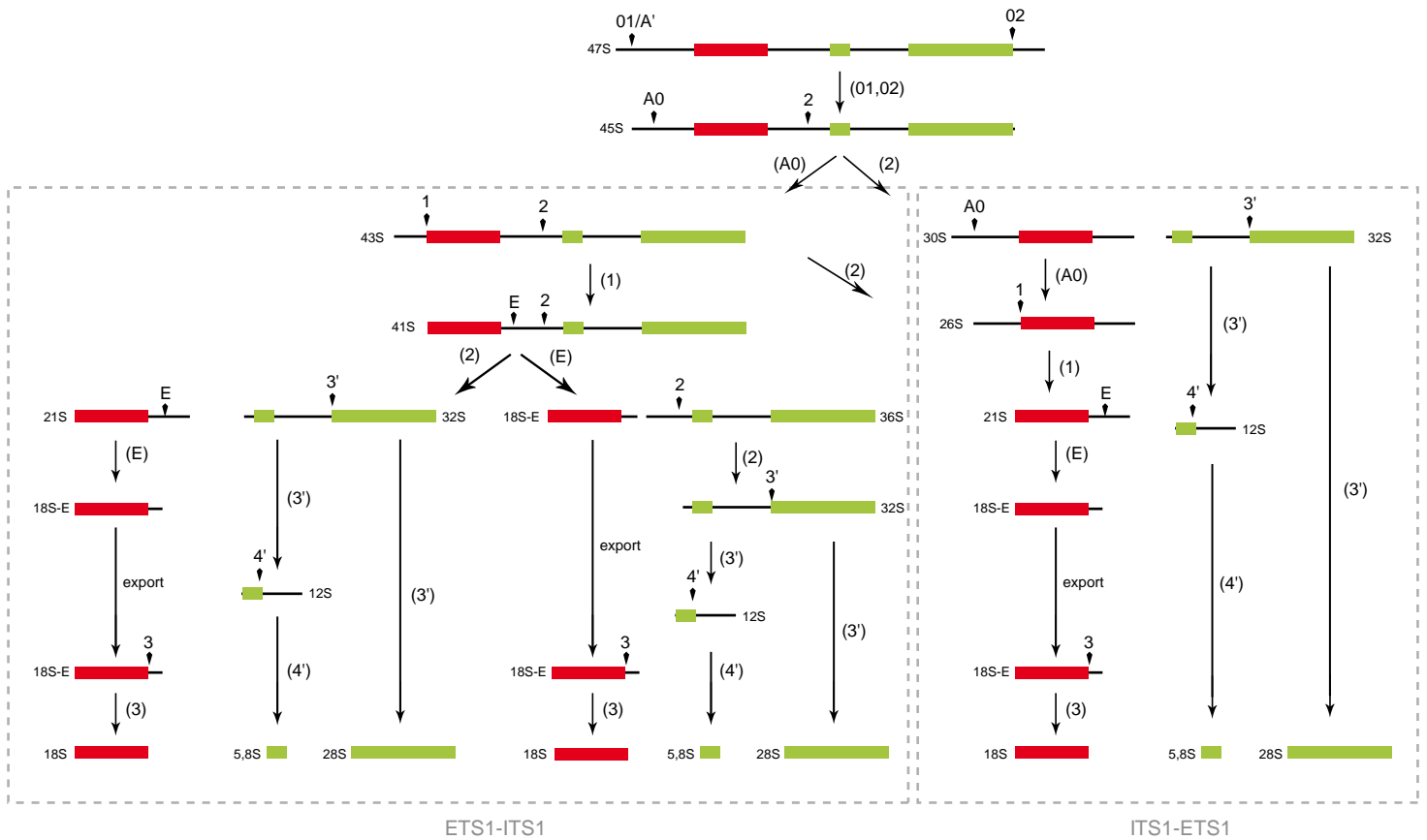
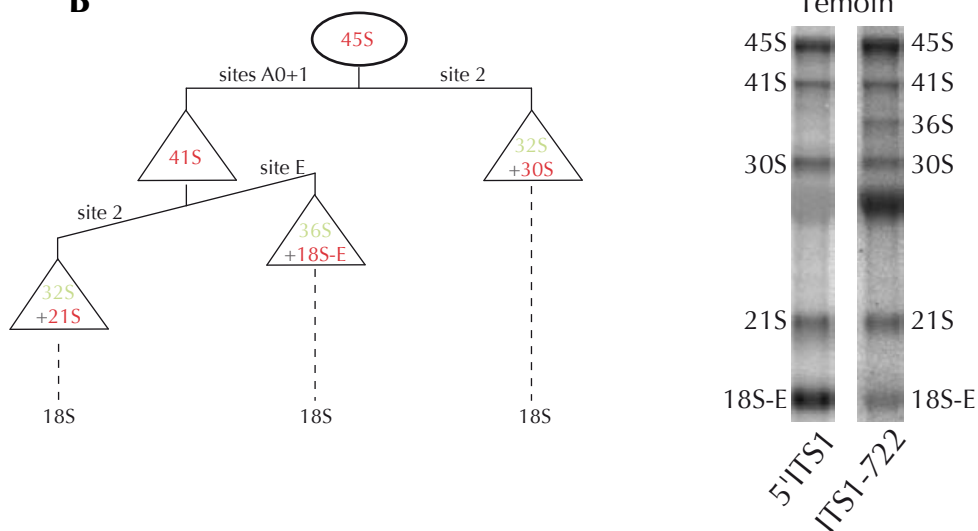
Le clivage au site $A_2/2$ entraîne la scission de la particule 90S composée par le pré-ARNr 35S/45S en particules pré-40S et pré-60S. Ces 2 particules suivent ensuite leur propre voie de maturation.

III – Maturation des pré-ARNr et assemblage des particules pré-ribosomiques

La production des ARNr matures à partir du pré-ARNr 47S nécessite des séries de clivages au sein des espaceurs les séparant ainsi que de nombreuses modifications post-transcriptionnelles, comme des pseudo-urydilations de bases ou des méthylations sur les groupements riboses.

*Chez les eucaryotes, les différentes régions constitutives du long précurseur 47S varient considérablement en taille et en séquence selon les espèces (Figure 11A et B) (Ajuh et al., 1991; Bourbon et al., 1988; Gonzalez et al., 1990; Klootwijk and Planta, 1989). Ces variations soulèvent la question de la conservation du processus de maturation au cours de l'évolution. Ainsi, des étapes supplémentaires ont été mises en évidence lors de la production des pré-ARNr de la petite sous-unité chez la souris et chez l'Homme comparé à la maturation des précurseurs de l'ARNr 18S chez la levure *S. cerevisiae* (Eichler and Craig, 1994; Rouquette et al., 2005; Srivastava et al., 2010). Différentes études menées chez les mammifères ont donc pu mettre en évidence une évolution de ce processus en lien avec l'évolution des espèces. Il est donc important d'approfondir l'étude de ce mécanisme chez les mammifères en général et chez l'Homme en particulier malgré les connaissances accrues de ce processus chez la levure. La levure reste cependant un organisme clef du point de vue génétique, permettant d'étudier le rôle mécanistique et fonctionnel de chaque facteur pré-ribosomique et protéine ribosomique.*

La synthèse du pré-ARNr 47S s'accompagne de l'assemblage co-transcriptionnel de protéines et de facteurs ribosomiques pour former la particule 90S. Le clivage au sein de l'ITS1 entraîne la scission de la particule 90S en particules ribosomiques pré-40S et pré-60S (Figure 12). Ces 2 types de particules suivent des voies de maturation indépendante l'une de l'autre, avec l'intervention de facteurs spécifiques pour chaque sous-unité. Les particules pré-40S et pré-60S sont ensuite exportées dans le cytoplasme où les dernières étapes de maturation auront lieu et produiront les sous-unités matures.

A**B****Figure 13 : Schéma de maturation des ARNr 18S, 5,8S et 28S.**

(A) Schéma de production des différents ARNr selon la séquentialité des clivages suivie. En rouge, l'ARNr 18S, en vert les ARNr 5,8S et 28S. (B) Représentation schématique de l'emprunt des différentes voies de maturation. La voie passant par le clivage au site 2 est plus souvent empruntée que le clivage direct au site E. À droite, des ARN totaux issus de cellules HeLa sont séparés et analysés en Northern blot. Les sondes utilisées pour la révélation s'hybrident à différents niveaux de l'ITS1, au niveau de l'extrémité 5' pour la sonde 5'ITS1, et au niveau du nucléotide 722 de l'ITS1 pour la sonde ITS1-722. Ces 2 sondes révèlent différents précurseurs des l'ARNr 18S, 5,8S et 28S.

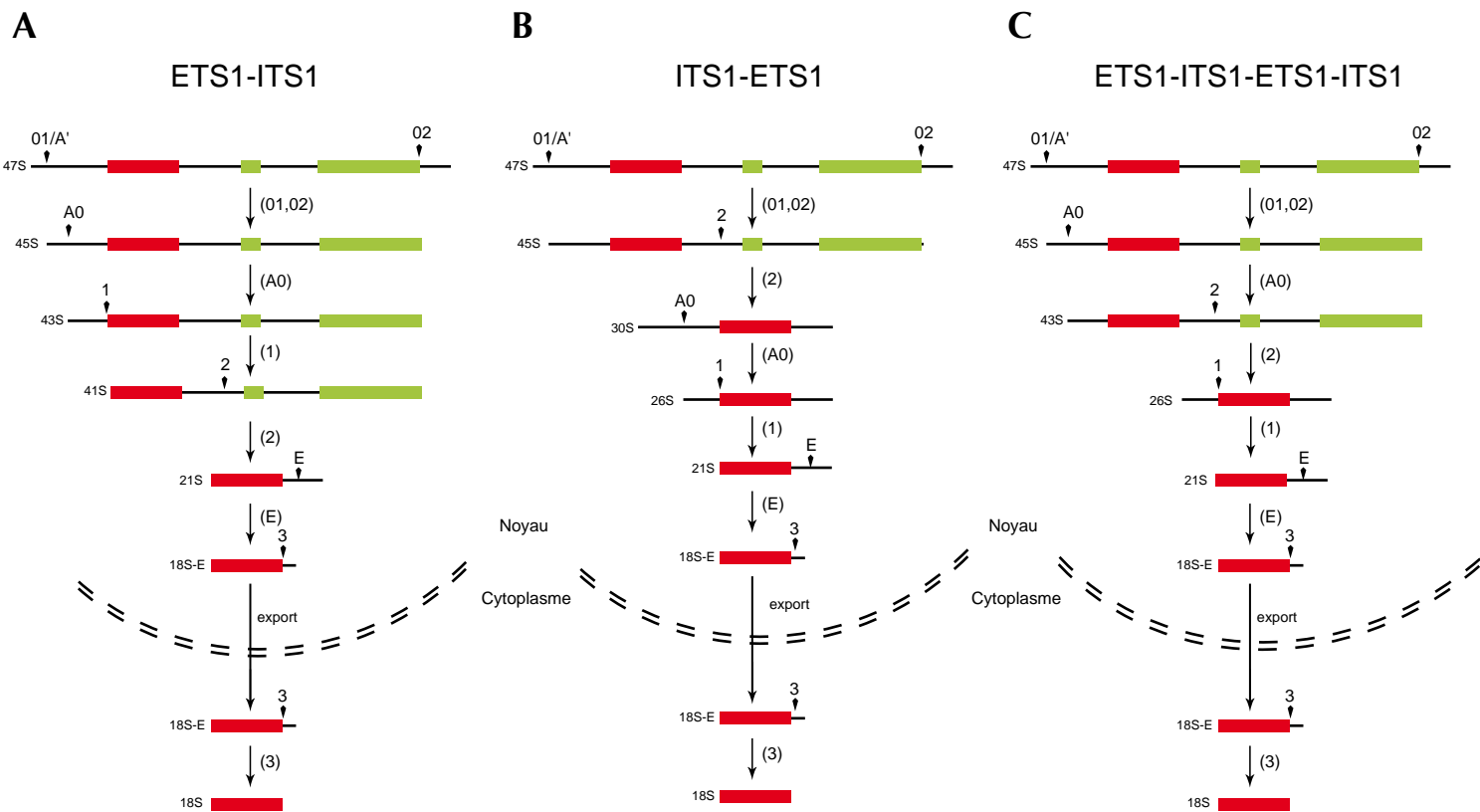


Figure 14 : Synthèse des différentes espèces de pré-ARNr de la petite sous-unité selon l'ordre de clivage entre l'ETS1 et l'ITS1.

(A) La maturation de l'ETS1 précède les clivages au sein de l'ITS1, produisant les pré-ARNr 41S puis 21S. (B) Lorsque l'ITS1 est clivé avant l'ETS1, le pré-ARNr 45S est mûri en pré-ARNr 30S puis en 26S, précurseur du 21S. (C) Quand l'ETS1 et l'ITS1 sont alternativement clivés, les pré-ARNr 41S et 30S ne sont plus observables, et le pré-ARNr 43S devient le précurseur du pré-ARNr 26S.

III.1 – Du pré-ARNr 47S aux ARNr matures 18S, 5,8S et 28S : clivages et maturation des espaceurs transcrits chez les mammifères.

Les sites de clivages au sein des espaceurs transcrits varient selon les espèces eucaryotes. Malgré cette variabilité, il existe cependant au moins 6 clivages constants au sein des différentes espèces, ceux qui encadrent et produisent les ARNr 18S, 5,8S et 28S matures (Figure 11A).

La séquence des clivages au sein des ITS ou ETS produit de nombreux précurseurs nucléotidiques. Selon la rapidité du clivage dans l'ITS1 ou dans l'ETS1, 2 voies de maturation peuvent être empruntées pour la production des particules 40S (Figure 13A). Les clivages en 01/A' et 02 sont considérés comme étant les premiers à prendre place, quelle que soit la séquence suivante des clivages, et conduisent au pré-ARNr 45S (Tiollais *et al.*, 1971). Par la suite, si les clivages dans l'ETS1 précèdent celui de l'ITS1 au site 2, des formes spécifiques sont détectables (Figure 14) : les pré-ARNr 43S et 41S. En revanche, si le clivage au site 2 a lieu avant ceux de l'ETS1, alors les pré-ARNr 30S et 26S sont formés de façon préférentielle. Les différentes espèces de pré-ARNr sont ainsi observables à l'équilibre dans des cellules humaines en culture (Bowman *et al.*, 1981; Hadjiolova *et al.*, 1993; Rouquette *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2010). Le clivage « direct » au site E au sein du 41S produit le pré-ARNr 18S-E mais également un précurseur particulier des ARNr matures 5,8S et 28S, le pré-ARNr 36S (Savino and Gerbi, 1990; Srivastava *et al.*, 2010). Ce type de clivage a pour l'instant été décrit uniquement chez la souris et le xénope. Les expériences de Northern blot menées au laboratoire ont pu mettre en évidence la présence d'un tel intermédiaire dans les cellules humaines en culture, présentées dans le chapitre Résultats-A.

Chez le xénope, la cinétique des clivages dans l'ETS1 ou dans l'ITS1 serait influencée par la particule snoRNP U3 (snoRNP pour « small nucleolar RiboNucleoProteic »). Le snoARN U3 est un ARN à boîte C/D qui intervient comme guide pour les coupures du pré-ARNr 47S et non pour la méthylation de l'ARNr, rôle « classique » des autres snoARN à

boîte C/D, comme le snoARN U8 par exemple (Borovjagin and Gerbi, 1999; Borovjagin and Gerbi, 2001). Ce snoARN se compose de deux domaines fonctionnels, les domaines I et II. La cinétique de clivage dépendrait de l'hybridation du snoARN U3 sur le pré-ARNr 47S : la maturation de l'ETS1 serait privilégiée par l'action du domaine I, tandis que le clivage dans l'ITS1 au site 3 (le site 3 du pré-ARNr murin correspond au site 2 du pré-ARNr humain) serait effectué avant la maturation de l'ETS1 grâce au domaine II (Borovjagin and Gerbi, 1999).

- Clivages précoces dans l'ETS1 et l'ETS2 : sites 01/A', A0, 1 et 02

Le pré-ARNr 47S est rapidement clivé au site 01/A', situé vers les nucléotides +650 chez la souris et +414 chez l'Homme (Kass *et al.*, 1987; Kent *et al.*, 2008). Cette coupure serait effectuée co-transcriptionnellement (Lazdins *et al.*, 1997). Le processus libérant l'extrémité 3' de l'ARNr 28S de l'ETS2 a également lieu très précocement, quasi simultanément ou juste après le clivage précoce de l'ETS1 au site 01/A'. Ces 2 coupures produisent le pré-ARNr 45S à partir du pré-ARNr 47S (Gurney, 1985; Labhart and Reeder, 1990).

Le site A0, d'abord décrit chez le xénope, a été mis en évidence plus récemment au sein des cellules humaines et murines. Il est situé au niveau des nucléotides +1643 chez l'Homme, +1673 chez la souris et +491 chez le xénope (Borovjagin and Gerbi, 2001; Kent *et al.*, 2008; Rouquette *et al.*, 2005). Chez la souris, le fragment d'ETS1 généré par cette coupure, ayant donc comme limites les sites 01/A' et A0, est observable par Northern blot en absence d'EXOSC10, l'orthologue murin de Rrp6p de levure. Rrp6p est connu chez *S. cerevisiae* comme un composant de l'exosome impliqué dans la dégradation des espaces transcrits (Fang *et al.*, 2005). Le clivage au site A0 au sein du 45S ou du 30S est à l'origine des pré-ARNr 43S et 26S.

Le 3^e clivage au sein de l'ETS1 est constitué par coupure au site 1, produisant les pré-ARNr 41S et 21S à partir du pré-ARNr 43S et 30S/26S, respectivement. Ce clivage libère un fragment de l'ETS1, de 24S (à partir du 30S) ou de 19S (à partir du 43S et du 26S) (Bowman *et al.*, 1983; Hannon *et al.*, 1989; Kent *et al.*, 2008). Le site 1 est très proche de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S mais ne correspond pas à ce nucléotide. En effet, il se situerait entre -3 et -8 nucléotides en amont de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Hannon *et al.*, 1989). La maturation de cette extrémité semble dépendante de composants présents dans la fraction cytoplasmique de cellules HeLa (Hannon *et al.*, 1989). Cependant, lors d'expérience de FISH dans des cellules HeLa contrôles, avec une sonde s'hybridant à cheval entre l'extrémité 3' de l'ETS1 et l'extrémité 5' du 18S, le cytoplasme n'est pas révélé par cette sonde contrairement au nucléoplasme. L'extrémité 5' de l'ARNr 18S semblerait donc subir l'étape ultime de sa maturation dans le nucléoplasme plutôt que dans le cytoplasme.

- Clivage au site 2 dans l'ITS1 : scission de la particule 90S en particules pré-40S et pré-60S

Le clivage au site 2 dans l'ITS1 entraîne la scission de la particule 90S en particules ribosomiques pré-40S et pré-60S, qui sont alors composées des pré-ARNr 30S, 26S ou 21S pour la particule pré-40S, et du pré-ARNr 32S pour la sous-unité pré-60S. La localisation de ce site n'a pas été définie avec précision dans les différentes espèces de mammifères. Chez le rat, le site 2 se situe vers les nucléotides -161/-163 par rapport à l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8S, et de manière similaire, il est localisé environ 100 nucléotides en amont de l'ARNr 5,8S chez le xénope (Borovjagin and Gerbi, 2001; Hadjiolova *et al.*, 1984b; Hadjiolova *et al.*, 1984c; Tycowski *et al.*, 1994). Chez l'homme, il a été localisé par Northern blot et se situe 150 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARN 5,8S (Idol *et al.*, 2007). Toutefois, les expériences de Northern blot effectuées dans l'équipe ont révélé que l'extrémité 3' du pré-ARNr 21S se situerait entre les nucléotides 790 et 800 de l'ITS1, soit environ 300 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8S. Chez la souris, le rat et le xénope,

l'extrémité 5' du pré-ARNr 32S correspond à l'extrémité 5' du 5,8S (Figure 12A) (Bowman *et al.*, 1983; Hadjiolova *et al.*, 1984c; Tycowski *et al.*, 1994). Chez l'homme, le clivage au site 2 serait donc suivi d'une maturation rapide de la séquence restante de l'ITS1 au sein du pré-ARNr 32S. Cette maturation serait réalisée par l'action d'une exonucléase, dont l'action dépend du snoRNP U22 (Tycowski *et al.*, 1994).

Chez la souris et l'homme, la scission de la particule 90S en pré-ribosomes 40S et 60S peut également avoir lieu par le clivage au site E à partir du 41S. Cette voie produit les pré-ARNr 18S-E pour la petite sous-unité immature et 36S pour la particule pré-60S (Srivastava *et al.*, 2010). Cette coupure reste cependant minoritaire vis-à-vis des autres voies possibles de maturation (Figure 13B).

- Clivages au sein de la particule pré-40S : maturation de l'ITS1

La maturation de l'ITS1 au sein de la particule pré-40S à partir du pré-ARNr 21S mène ensuite à la production d'un intermédiaire dont l'extrémité 3' correspond au site de clivage E. Ce site de clivage a récemment été mis en évidence chez l'homme et positionné à +24 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S (Rouquette *et al.*, 2005). Un intermédiaire de maturation supplémentaire est observable lors de la perte d'expression d'une protéine ribosomique de la petite sous-unité, RPS19. En absence de cette protéine, la maturation du 21S en 18S-E est inhibée, et un nouvel intermédiaire de maturation apparaît et s'accumule, le pré-ARNr 20S. L'extrémité 3' de cette espèce se terminerait entre les nucléotides 755 et 766 de l'ITS1 (Idol *et al.*, 2007). Les expériences menées au cours de ma thèse m'ont également conduit à mieux caractériser cet intermédiaire et à remettre en partie en cause ce résultat. Mes données, présentées dans le chapitre Résultats-A, discutent en détails de ce point.

Le pré-ARNr 18S-E est ensuite exporté dans le cytoplasme, au sein de la particule ribosomique pré-40S (Rouquette *et al.*, 2005). La dernière étape de maturation a lieu dans ce

compartiment cellulaire et produit l'ARNr 18S mature, par clivage au site 3. Chez la souris, il a été montré qu'une séquence minimale de l'ARNr 18S et de l'extrémité 5' de l'ITS1 était requise pour que le clivage au site 3 s'effectue. En effet, 60 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et 48 nucléotides du côté 5' de l'ITS1 sont nécessaires et suffisants pour que la coupure au site 3 ait lieu (Hadjiolova *et al.*, 1994).

- Clivages au sein de la particule pré-60S : maturation de l'ITS2 par coupure aux sites 3' et 4'

La coupure au site 3' au sein du pré-ARNr 32S produit l'ARNr 28S et le pré-ARNr 12S. L'extrémité 3' de cette dernière espèce correspond au nucléotide 795 de l'ITS2 (Bowman *et al.*, 1981; Bowman *et al.*, 1983; Dudov *et al.*, 1983; Hadjiolova *et al.*, 1984a). En se basant sur les travaux effectués chez *S. cerevisiae*, il est admis que ce clivage est également un processus endonucléolytique chez les mammifères (Faber *et al.*, 2006). De même, les études menées chez *S. cerevisiae* montrent que la maturation du pré-ARNr 12S en ARNr 5,8S se fait grâce à une exonucléase 3'-5' (Mitchell *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1997). Chez l'homme, la production de l'ARNr 5,8S à partir du pré-ARNr 12S se ferait également par une exonucléase 3'-5', ISG20L2 (pour « Interferon-stimulated 20-kDa exonuclease-like 2 ») (Coute *et al.*, 2008). Cependant, d'autres études présentent l'exosome comme le complexe enzymatique impliqué dans la maturation de cette extrémité de l'ITS2 associé au 5,8S. L'exosome est composé de 9 protéines-coeurs¹ (Liu *et al.*, 2006) et de protéines associées, comme PM/ScI-100, MPP6, C1D et hMtr4. Ce complexe serait impliqué dans la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 5,8S (Schilders *et al.*, 2005; Schilders *et al.*, 2007). ISG20L2 ou l'exosome pourrait avoir des fonctions complémentaires ou être responsables d'étapes sensiblement différentes lors de la maturation de l'extrémité 5' de l'ITS2. Il est également

¹ : hRrp4, hRrp40, hRrp41, hRrp42, hRrp46, hMtr3, OIP2, PM/ScI-75 et hCsl4

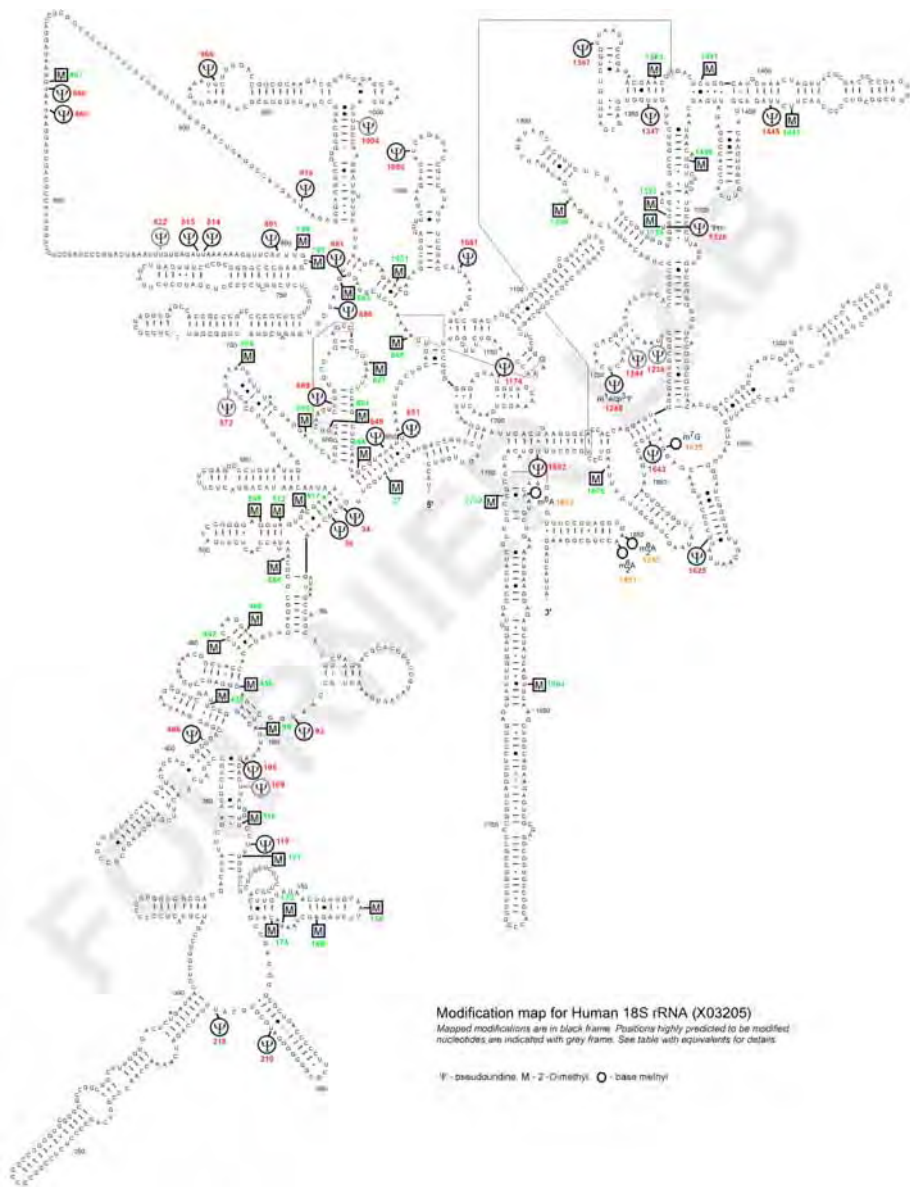


Figure 15 : Carte des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr 18S chez l'Homme.

M : Méthylation

Ψ : Pseudo-urydilation.

D'après <http://people.biochem.umass.edu/fournierlab/3dmodmap/>

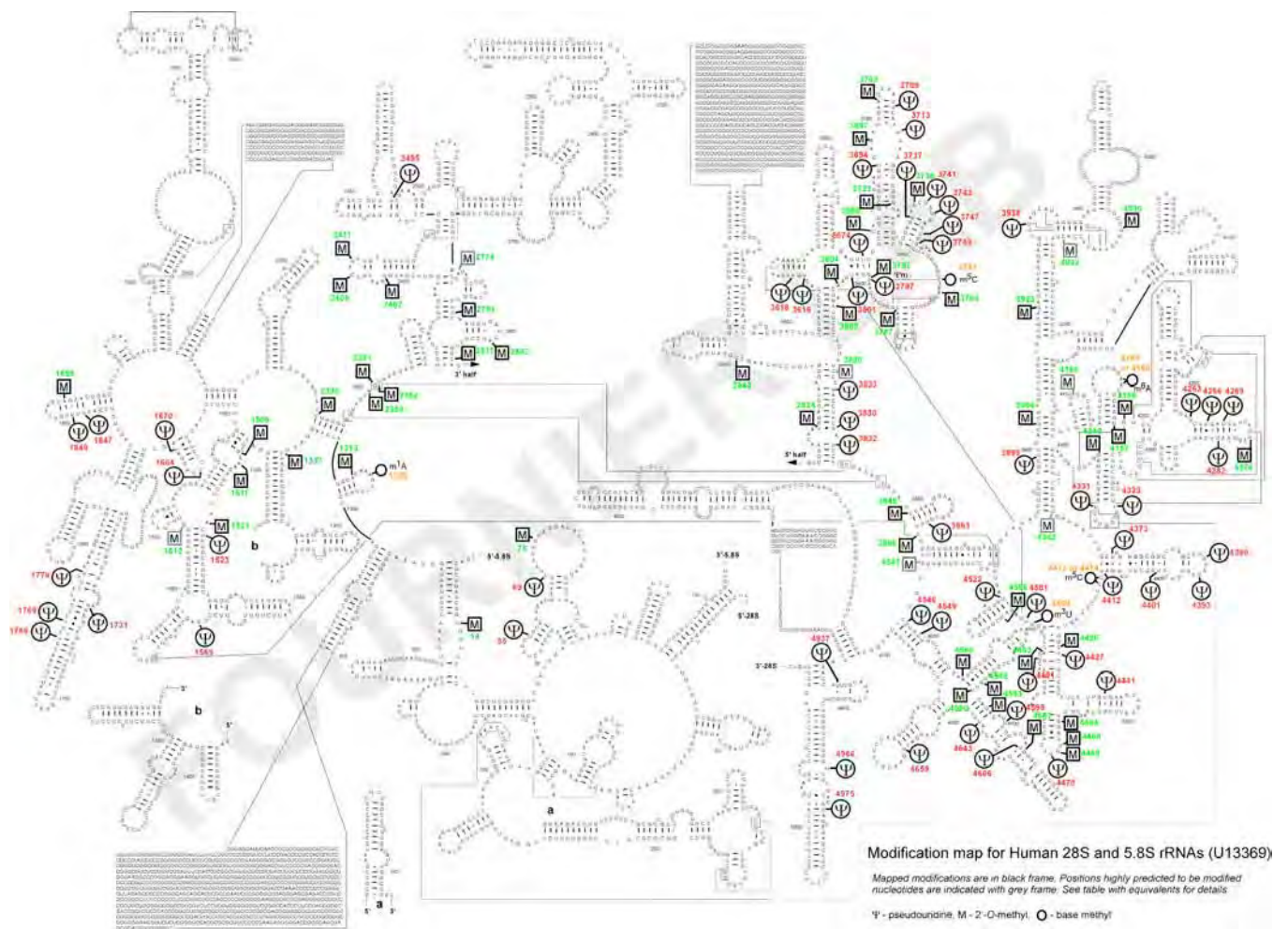


Figure 16 : Carte des modifications post-transcriptionnelles des ARNr 5,8S et 28S chez l'Homme.

M : Méthylation

Ψ : Pseudo-urydilation.

D'après <http://people.biochem.umass.edu/fournierlab/3dmodmap/>

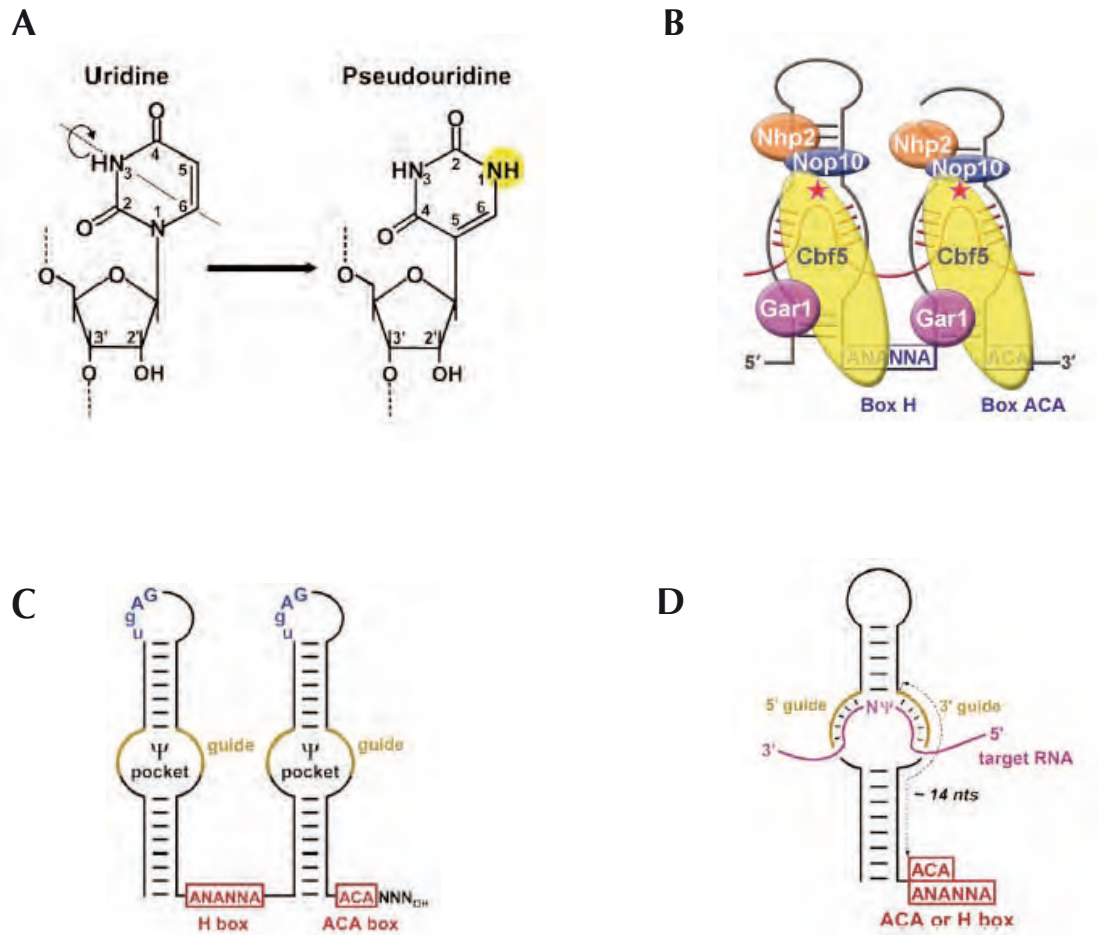


Figure 17 : Pseudouridylation par les snoRNP H/ACA.

(A) La pseudouridylation consiste en l'isomérisation de l'uridine, donc à l'inversion de la base sur l'axe 3-6. (B) Une snoRNP H/ACA est composée d'un snoARN et de 4 protéines cœur, Nhp2, Nop10, Cbf5 et Gar1. (C) Le snoARN a une structure en tige boucle au milieu de laquelle se trouve la poche de pseudouridylation. À la base de chaque tige il y a des séquences caractéristiques de cette famille de snoARN, la boîte H (ANANNA) et la boîte ACA (ACA). (D) La pseudouridylation a lieu au niveau de la poche, sur laquelle s'hybride l'ARN cible à modifier.

D'après Reichow, 2007 et Kiss, 2010.

possible que ISG20L2 soit une protéine nécessaire pour le rôle l'exosome dans cette étape de la maturation de l'ARNr 5,8S.

Les 295 nucléotides de l'ITS2 encore associés à l'extrémité 5' du 28S seraient ensuite éliminés via une coupure endonucléolytique ou grignotés par une exonucléase 5'-3'. Chez la levure, l'extrémité 3' de l'ITS2 est éliminée par une exonucléase 5'-3', produisant l'ARNr 25S mature (Geerlings *et al.*, 2000).

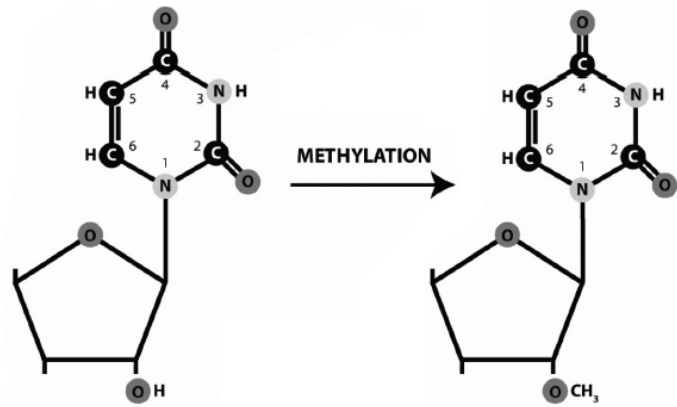
III.2 – Du pré-ARNr 47S aux ARNr matures 18S, 5,8S et 28S : modifications post-transcriptionnelles chez les mammifères

La maturation du pré-ARNr 47S en ARNr 18S, 5,8S et 28S nécessite les clivages décrits ci-dessus mais également des modifications post-transcriptionnelles (Figures 15 et 16). Ces modifications sont des pseudouridylation, qui correspondent à une isomérisation de l'uridine (Figure 17A) ou des méthylation sur les riboses de certains nucléotides (Figure 18A). Les pseudouridylation sont guidées par les snoARN à boîte H/ACA, tandis que les snoARN à boîte C/D sont impliquées dans les 2'O-méthylation.

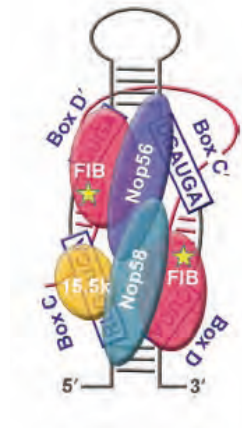
- Pseudouridylation

De nombreuses snoRNP à boîte H/ACA sont impliquées dans la maturation des pré-ARNr. Elles ont toutes en commun 4 protéines conservées, la dyskérine, hGar1, hNhp2 et hNop10, qui sont associées à un snoARN à boîte H/ACA (Figure 17B) (Meier, 2005). Les snoARN à boîte H/ACA sont appelés ainsi à cause de la présence dans leur séquence de motifs conservés appelés H et ACA. Ces petits ARN sont des ARN guides responsables de la sélection du nucléotide à modifier. Les snoARN à boîte H/ACA comportent 2 tiges-boucles entourant la boîte H (ANANNA) et suivies de la boîte ACA (Figure 17C) (Ganot *et al.*, 1997a; Kiss *et al.*, 2010). Les guides de pseudouridylation se localisent au niveau des 2 tiges-boucles dans une région appelée poche de pseudouridylation. Le snoARN s'hybride au pré-

A



B



C



D

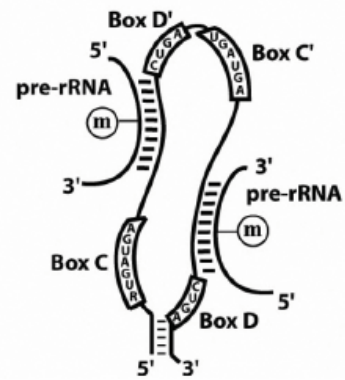


Figure 18 : 2'-O méthylation par les snoRNP C/D.

(A) La 2'-O méthylation consiste en l'ajout d'un méthyl sur la position 2' du ribose. (B) Une snoRNP C/D est composée d'un snoARN et de 4 protéines coeur, la fibrillarine, Nop5, Nop58 et 15,5 kDa. (C) Le snoARN a une structure en tige boucle au milieu de laquelle se trouvent les séquences caractéristiques de cette famille de snoARN, la boîte C (PuUGAUGA) et la boîte D (CUGA), ainsi que 2 boîtes C' et D' qui sont des séquences dégénérées des boîtes C et D. (D) La méthylation du ribose a lieu entre les boîtes C et D (ou C' et D').
D'après Reichow, 2007 et Henras, 2008.

ARNr au niveau de la poche de pseudouridylation via une séquence complémentaire entourant le nucléotide-cible à modifier (Ganot *et al.*, 1997b). La réaction de modification est catalysée par la dyskérine sur le nucléotide se trouvant à 14 ou 16 nucléotides en amont de la boîte H ou de la boîte ACA, selon la poche sur laquelle s'est lié le pré-ARNr (Figure 17D) (Ganot *et al.*, 1997a).

Bien que les pseudouridines représentent les nucléotides les plus abondamment modifiés dans la cellule, leurs fonctions précises restent encore à décrire. L'isomérisation de l'uridine affecte l'environnement local en augmentant la rigidité du nucléotide et en stabilisant localement les bases (Arnez and Steitz, 1994; Meroueh *et al.*, 2000). Les ARNr de tous les organismes contiennent des pseudouridines et leur nombre augmente avec l'évolution : 11 pseudouridines sont présentes dans les ARNr d'*Escherichia coli*, 44 chez *S. cerevisiae* et environ 91 chez l'homme (Maden, 1990; Ofengand, 2002). Par ailleurs, bien que les pseudouridylation soient effectuées au niveau des précurseurs des ARNr 18S, 5,8S et 28S, elles se localisent principalement dans les régions des ARNr matures, ce qui suggère un rôle important au sein du ribosome (Figure 15 et 16) (Brand *et al.*, 1978; Jeanteur *et al.*, 1968).

- 2'O-méthylation

De la même manière que pour les snoRNP à boîte H/ACA, les snoRNP à boîte C/D sont composées de 4 protéines conservées chez tous les eucaryotes, la fibrillarine, NHPX/15,5kDa, Nop56 et Nop58 (Figure 18B) (Aris and Blobel, 1991; Cavaille *et al.*, 1996; Filippini *et al.*, 2000; Lyman *et al.*, 1999; Reichow *et al.*, 2007). Ces 4 protéines sont associées à un snoARN à boîte C/D, qui comprend 2 séquences conservées, la boîte C (PuUGAUGA) et la boîte D (UCUGA). Ces snoARN possèdent également un autre couple de motifs conservés, les boîtes C' et D', qui sont des boîtes C et D dégénérées (Figure 18C).

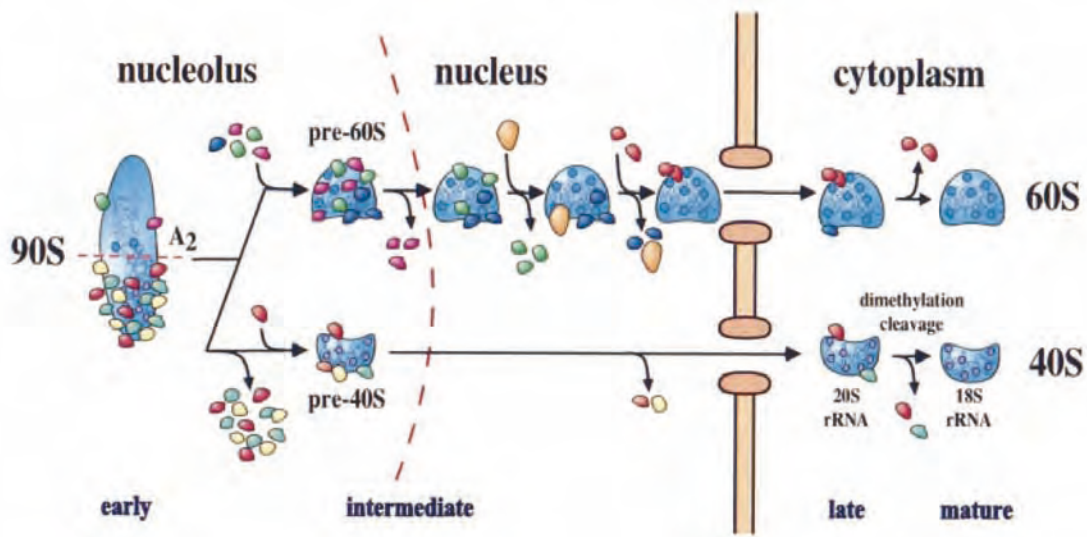


Figure 19 : Schéma d'assemblage, de maturation et d'export des sous-unités ribosomiques chez la levure.

Les snoARN, ainsi que certaines protéines ribosomiques et certains facteurs pré-ribosomiques s'assemblent au pré-ARNr 35S néo-transcrit pour former la particule 90S. Le clivage du pré-ARNr 35S entraîne la scission de la particule 90S en particules pré-40S et pré-60S. Ces 2 sous-unités pré-ribosomiques poursuivent leur maturation pendant leur transport jusque dans le cytoplasme, où elles subissent leurs ultimes étapes de maturation.

D'après Schäfer, 2003

Le pré-ARNr s'hybride sur 10-20 nucléotides en amont de la boîte D et la réaction de 2'O-méthylation s'effectue sur le 5^e nucléotide précédent la boîte D (Figure 18D) (Kiss-Laszlo *et al.*, 1998). La fibrillarine est l'enzyme qui catalyse l'addition du méthyl sur le ribose du nucléotide à modifier. La totalité des protéines formant le snoRNP est essentielle pour la bonne localisation de cette particule ainsi que pour son activité (Gautier *et al.*, 1997; Verheggen *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 2002).

III.3 – Composition des particules pré-ribosomiques chez la levure *S. cerevisiae*

Les études de protéomique menées chez *S. cerevisiae* ont décrit la composition des particules pré-ribosomiques à différents stades de leur maturation ainsi que la fonction de nombreux facteurs pré-ribosomiques (pour revue (Fromont-Racine *et al.*, 2003; Henras *et al.*, 2008; Kressler *et al.*, 2010)).

La composition de la particule 90S a été décrite grâce à des expériences d'immunoprécipitations de facteurs pré-ribosomiques étiquetés, caractérisés comme impliqués dans les étapes précoces de la maturation des ribosomes (Grandi *et al.*, 2002). Cette étude a mis en évidence que cette particule pré-ribosomique est essentiellement composée de la snoRNP U3 et de facteurs requis pour la maturation, l'assemblage et l'export de la particule pré-40S (Figure 19) (Grandi *et al.*, 2002; Schäfer *et al.*, 2003).

La composition des particules pré-40S a été analysée de la même manière, décrivant différentes particules selon le stade de maturation, nucléaire ou cytoplasmique (Figure 20 et 21) (Leger-Silvestre *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2003).

La composition des particules pré-60S a été abordée quelques années auparavant par des techniques de TAP-TAG (Bassler *et al.*, 2001; Fatica and Tollervey, 2002; Harnpicharnchai *et al.*, 2001). Les analyses de la composition des particules aux différentes étapes de maturation des pré-ARNr ont permis de décrire avec précision les associations-

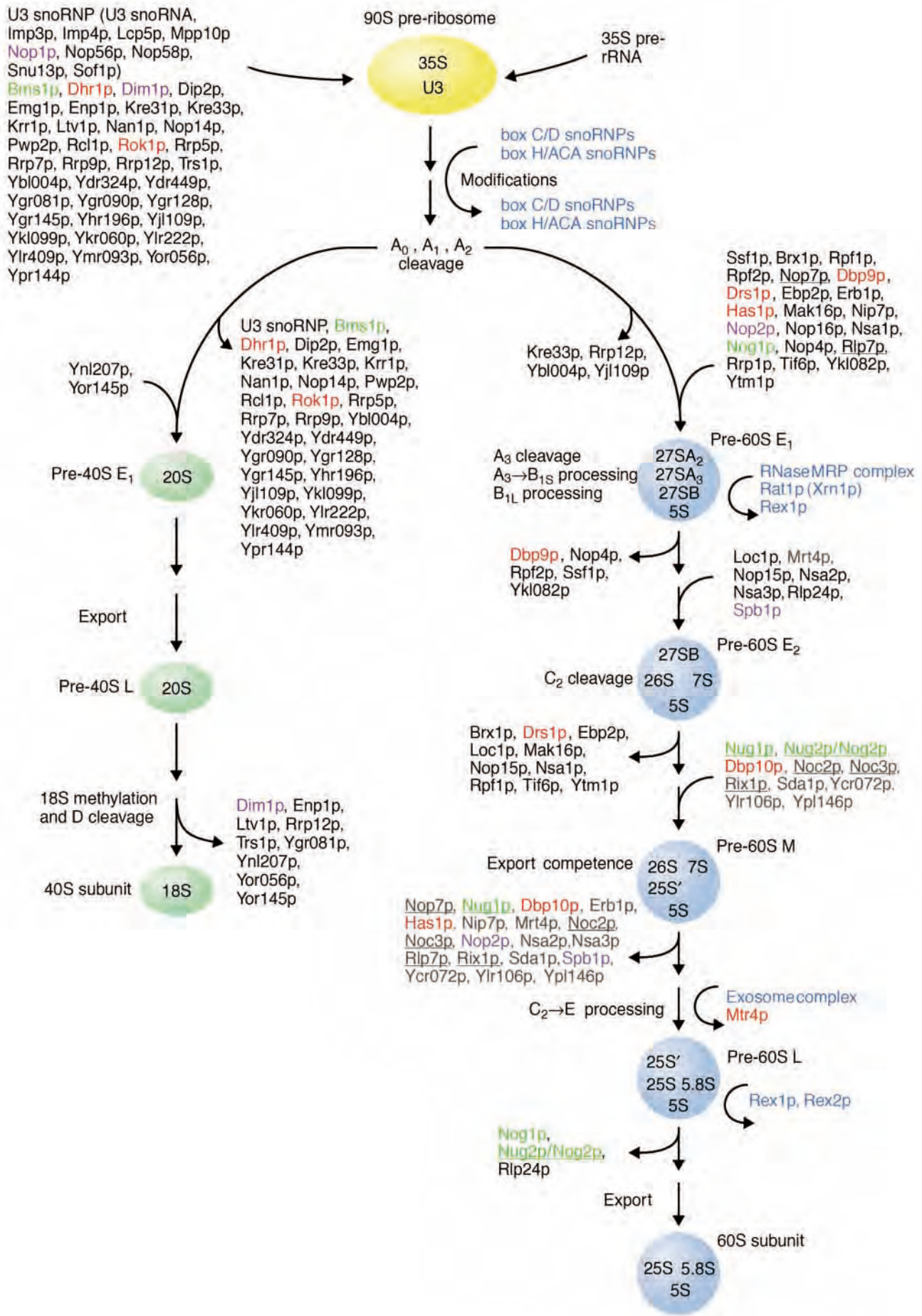


Figure 20 : Composition des particules pré-ribosomiques aux différents stades de maturation

La compilation des résultats obtenus en protéomique ont permis d'établir cette représentation schématique de la dynamique d'association et de dissociation de différents facteurs pré-ribosomiques et des snoRNP. La particule 90S est composé du pré-ARNr 35S et de la snoRNP U3.

Les protéines en rouge sont des hélicases à ARN potentielles, les protéines en vert font partie des GTPases, celles en violet font parti des méthyl-transférases, et les protéines en bleu sont des exo- ou des endonucléases.

D'après Fatica et al., 2002

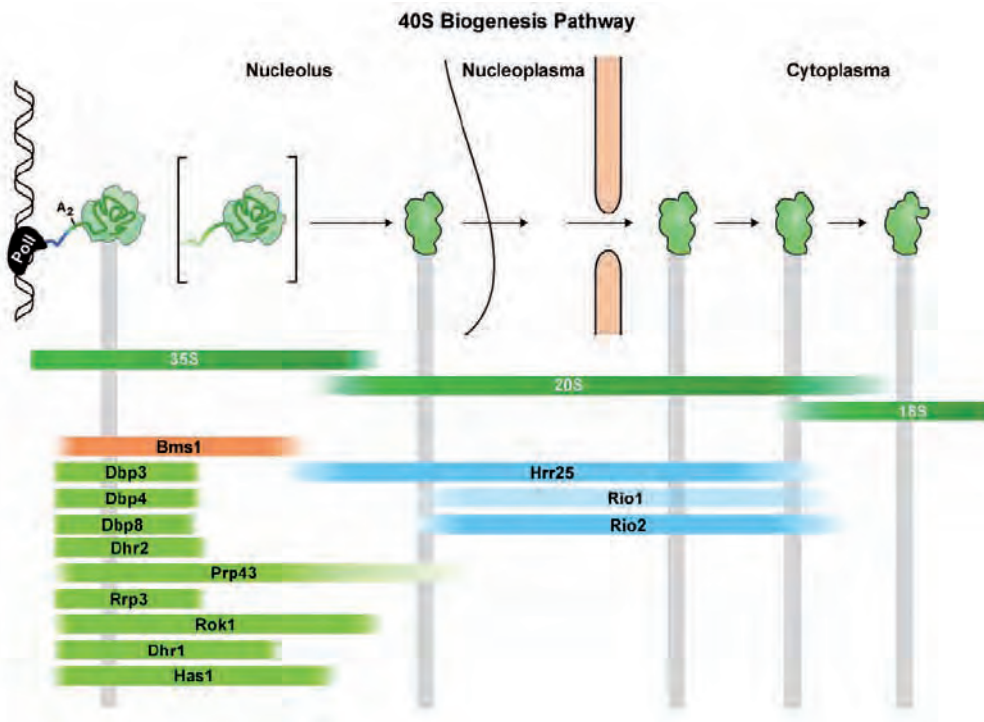


Figure 21 : Dynamique d'association de certains facteurs pré-ribosomiques spécifiques de la sous-unité 40S lors de sa maturation.

Le pré-ARNr 35S naissant est replié et modifié pour former le premier précurseur de la sous-unité 40S. Les clivages aux sites A0, A1 et A2 génèrent le pré-ARNr 20S, et s'accompagnent de l'échange de nombreux facteurs pré-ribosomiques. La formation du bec de la sous-unité 40S et l'ultime maturation du pré-ARNr 20S en ARNr 18S ont lieu dans le cytoplasme.

En vert foncé : composition en pré-ARNr et ARNr ; en orange : les GTPases ; en bleu clair : les kinases ; en vert clair : les ATPases.

D'après Kressler et al., 2010

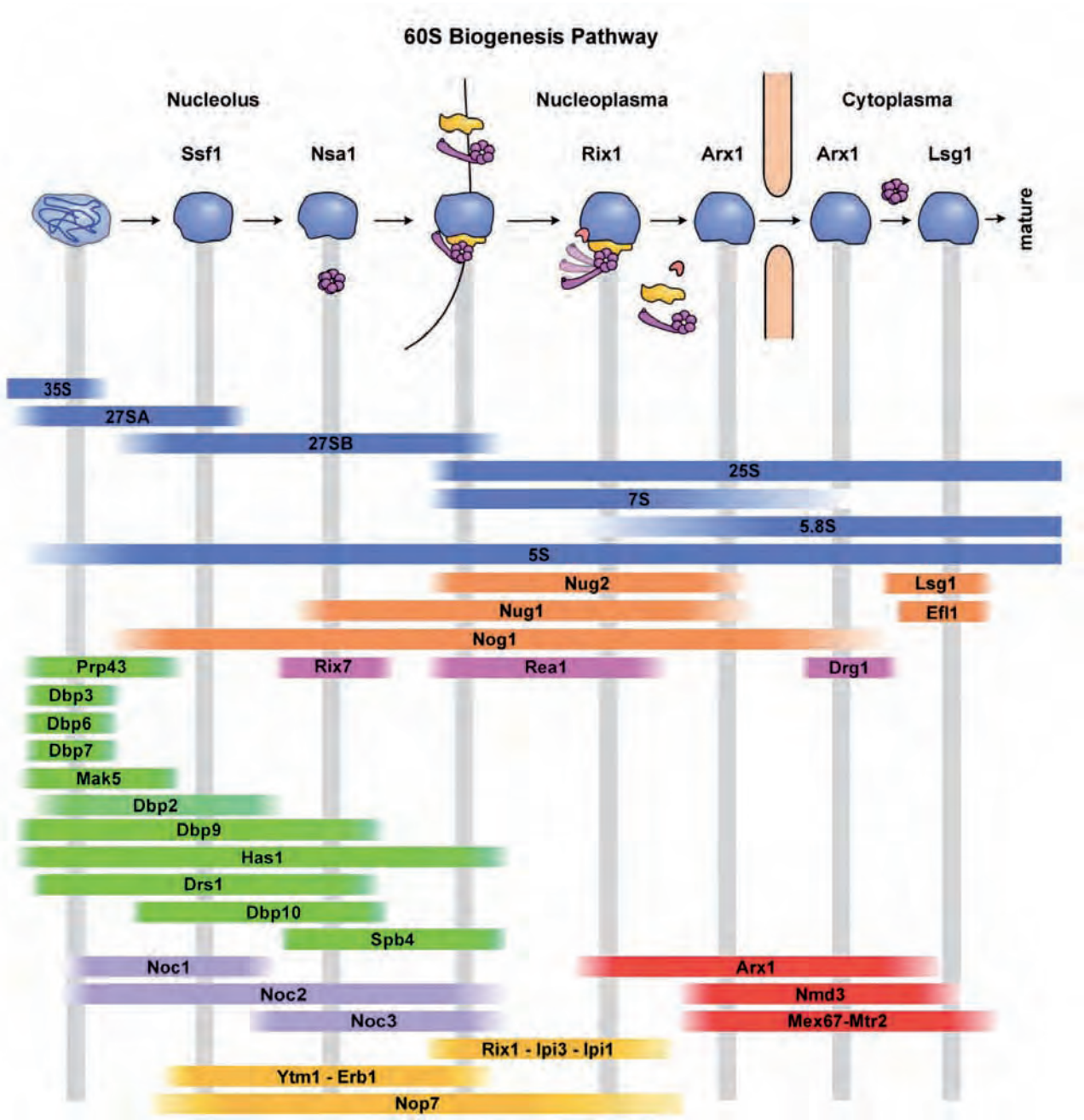


Figure 22 : Dynamique d'association de certains facteurs pré-ribosomiques spécifiques de la sous-unité 60S lors de sa maturation.

Avant l'export de la particule pré-60S, Rea1p (en rose) libère de manière ATP-dépendante les facteurs Rix1p (en jaune) et Rsa4p (en orange sur le schéma) en formant un sous-complexe. Cette modification structurale permettrait l'export de la particule pré-60S dans le cytoplasme. Une fois dans ce compartiment cellulaire, la sous-unité pré-60S subit les dernières étapes de maturation.

En bleu foncé : composition en pré-ARNr et ARNr ; en orange : les GTPases ; en rose et en vert : les ATPases. D'après Kressler et al., 2010

dissociations des facteurs pré-ribosomiques à chaque stade (Figure 20 et 22) (Fatica and Tollervey, 2002; Fromont-Racine et al., 2003; Nissan et al., 2002; Schäfer et al., 2003)

Les études approfondies menées sur les facteurs pré-ribosomiques ont permis de préciser le rôle exact de certains d'entre eux, mais également de répertorier plusieurs groupes en fonction de leur activité, telle que des hélicases à ARN, des AAA ATPases, des GTPases, des méthyltransférases, des chaperones et des kinases (Figure 21 et 22) (pour revue (Fromont-Racine et al., 2003; Kressler et al., 2010)).

III.4 – Protéines ribosomiques : assemblage et implication au cours de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères

Des études menées dans les années 1970-1980 ont permis de proposer un ordre d'association des protéines ribosomiques eucaryotes aux particules en cours de maturation.

Les protéines ribosomiques peuvent être rassemblées en 2 groupes : les protéines qui s'associent précocement aux particules ribosomiques immatures et les protéines qui sont trouvées associées plus tardivement. Quatorze protéines ribosomiques de la petite sous-unité¹ (Auger-Buendia and Longuet, 1978; Lastick, 1980) et 18 de la grande sous-unité² (Lastick, 1980) s'associent précocement aux particules ribosomiques immatures. Les autres protéines ribosomiques s'assembleront aux pré-ribosomes après la séparation des particules pré-40S et pré-60S suite au clivage au sein de l'ITS1.

Les étapes auxquelles sont requises les protéines ribosomiques ont été étudiées par la perte d'expression de ces protéines via l'action de siARN (« small interference RNA »)

¹ : RPS3a, RPS4, RPS5, RPS6, RPS11, RPS13, RPS14, RPS16, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS27, RPS28

² : RPL3, RPL5, RPL9, RPL11, RPL12, RPL14, RPL17, RPL18, RPL21, RPL23, RPL23a, RPL26, RPL27, RPL28, RPL30, RPL31, RPL35a, RPL36

spécifiques d'ARNm cibles. Cette stratégie permet de déterminer à quel stade la protéine ribosomique étudiée est requise (Choesmel *et al.*, 2007; Choesmel *et al.*, 2008; Doherty *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2008; Flygare *et al.*, 2007; Gazda *et al.*, 2008; Idol *et al.*, 2007; Robledo *et al.*, 2008; Rouquette *et al.*, 2005). La fonction de beaucoup de ces protéines ribosomiques a été étudiée car elles présentaient un lien avec des pathologies, comme par exemple l'Anémie de Diamond-Blackfan.

Un crible systématique des protéines ribosomiques de la petite sous-unité a été réalisé très récemment au sein de l'équipe et a mis en évidence la classification des protéines ribosomiques en 2 sous-ensembles, les i-RPS (« initiation RPS ») et les p-RPS (« progression RPS ») (Doherty *et al.*, 2010). Les i-RPS regroupent 16 des 32 protéines ribosomiques de la petite sous-unité¹. L'absence d'une de ces protéines occasionne l'accumulation des pré-ARNr 45S et 30S et la disparition des autres précurseurs. Ce phénotype est caractéristique d'un défaut précoce de maturation de l'ETS1 et de l'ITS1 après le clivage au site 2. Le second groupe de protéines ribosomiques mis en évidence dans cette étude est le groupe des p-RPS, comprenant 16 RPS². La perte d'expression des protéines de ce groupe n'induit pas un phénotype unique car elles sont requises pour les différentes étapes de maturation à partir d'un stade intermédiaire (particules pré-40S contenant les pré-ARNr 30S, 26S ou 21S) jusqu'au stade le plus tardif (particules pré-40S cytoplasmiques composées par le pré-ARNr 18S-E). De fait, les phénotypes sont variés, par exemple des défauts de maturation de l'ETS1 ou des anomalies de clivages de l'ITS1 suite à la scission de la particule 90S en particules pré-40S et pré-60S. Les phénotypes observés suite à l'absence d'une p-RPS comprennent

¹ : RPS3a, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS11, RPS13, RPS14, RPS15a, RPS16, RPS23, RPS24, RPS27 et son isomère RPS27L, et RPS28

² : RPSA, RPS2, RPS3, RPS10, RPS12, RPS15, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS25, RPS26, RPS27a, RPS29 et RPS30

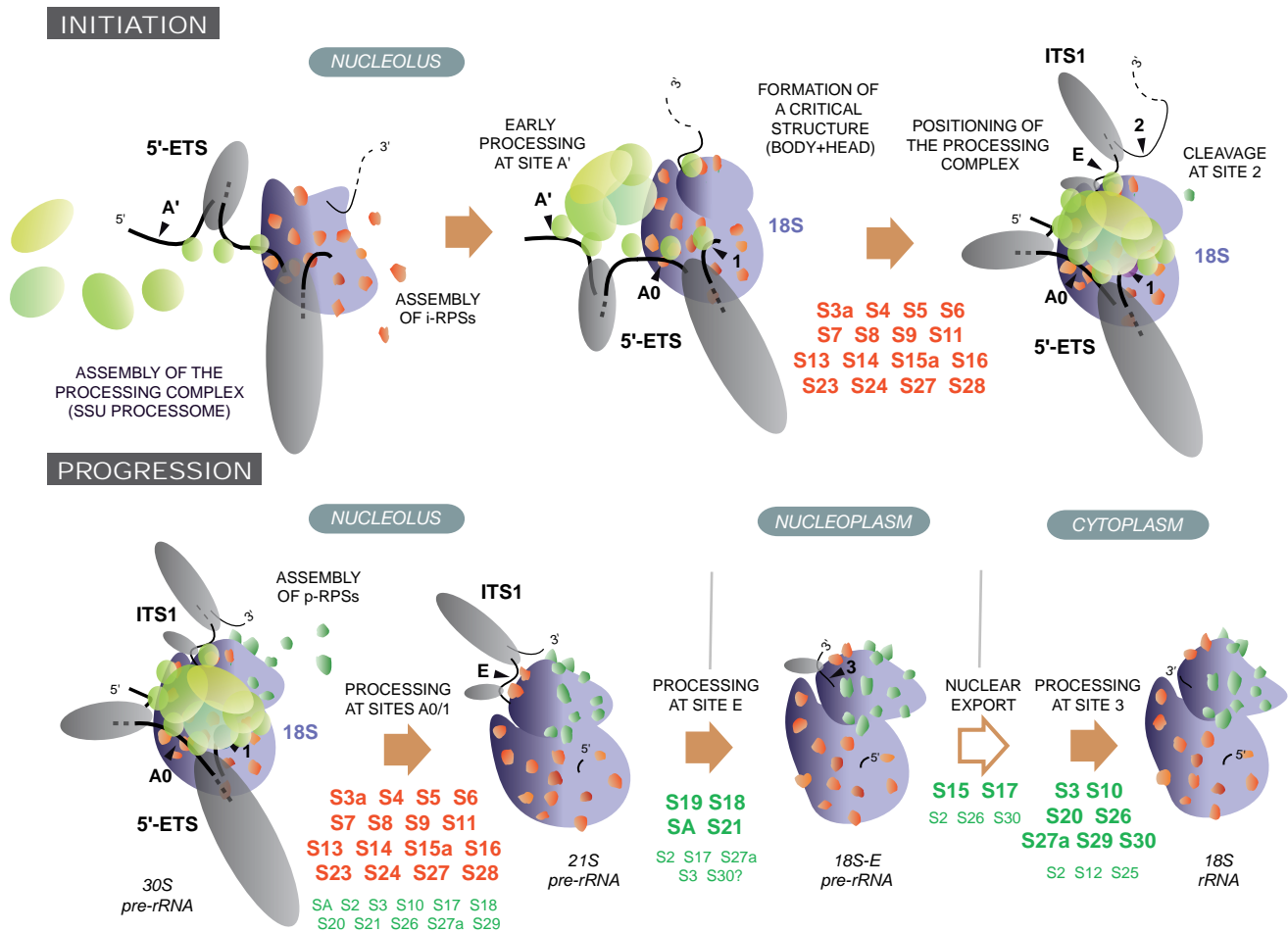


Figure 23 : Implication des i-RPS et des p-RPS dans la biogenèse de la particule ribosomique 40S.

Les i-RPS (en orange) et les facteurs pré-ribosomiques précoces (en vert clair) s'assemblent au pré-ARNr 45S naissant, formant la particule 90S. Les i-RPS participeraient au repliement de l'ARNr 18S, tandis que l'ETS1 se replierait en structures secondaires. Si cette étape est réalisée de manière correcte, la maturation de l'ETS1 pourrait alors s'effectuer. Les p-RPS (en vert foncé), principalement impliquées dans les étapes tardives, s'assembleraient alors progressivement à la particule pré-40S. Suite au clivage au site E et à la libération du "SSU processome", la particule pré-40S sortirait du nucléole pour être exportée dans le cytoplasme, où les dernières étapes de maturation ont lieu.

L'implication de chaque protéine ribosomique est indiquée au niveau de l'étape à laquelle elles sont requises. D'après O'Donohue et al., 2010.

également des défauts d'export cytoplasmique des particules ribosomiques pré-40S, ainsi que des anomalies de maturation cytoplasmique du pré-ARNr 18S-E en ARNr 18S. Cette étude précise à quel stade chaque protéine ribosomique est requise de façon critique, mais ne permet cependant pas de déterminer le moment auquel ces protéines s'associent aux particules pré-ribosomiques (Figure 23). Cependant, les études d'assemblage menées dans les années 1970-1980 ont permis de classer les protéines ribosomiques en 2 groupes selon leur stade d'association aux particules pré-ribosomiques en cours de maturation. La comparaison des groupes définis par ces études de reconstitution à ceux déterminés selon le stade d'implication des RPS lors de la maturation des particules pré-40S met en évidence une corrélation entre assemblage et maturation. En effet, les i-RPS, qui sont impliquées dans les étapes précoces de maturation, correspondent aux RPS qui s'assemblent précocement à la particule 90S, tandis que les p-RPS, impliquées à des stades plus tardifs, regroupent les RPS s'associant plus tardivement aux particules pré-40S en cours de maturation. Par ailleurs, les i-RPS et les p-RPS ne présentent pas la même localisation sur la sous-unité 40S. En effet, en se basant sur les homologues bactériens des protéines ribosomiques, nous pouvons constater que les protéines ribosomiques correspondant au groupe des i-RPS se localisent plutôt au niveau du corps de la particule 40S tandis que les p-RPS se rassembleraient au niveau de la tête de cette sous-unité (Figure 23). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus chez la levure, qui montrent que les protéines impliquées dans l'export nucléocytoplasmique et dans l'étape de maturation cytoplasmique de la particule pré-40S se localisent au niveau de la tête de la sous-unité (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Ferreira-Cerca *et al.*, 2007).

III.5 – Composition des particules pré-ribosomiques au cours de leur maturation, chez les mammifères

En plus des protéines ribosomiques, la biogenèse des sous-unités ribosomiques requiert l'intervention d'environ 200 facteurs pré-ribosomiques. Les facteurs pré-ribosomiques s'associent temporairement aux pré-ribosomes mais sont exclus des ribosomes matures. Certains sont spécifiques de la maturation d'une sous-unité tandis que d'autres sont impliqués globalement dans la biogenèse des ribosomes.

- Particules 90S

La composition de la particule 90S humaine a été décrite au début des années 2000 par immunoprécipitation de la nucléoline et analyse de la composition de la particule qui lui est associée (Yanagida *et al.*, 2001). La nucléoline est requise pour les étapes précoces de maturation de l'ETS1, particulièrement pour le clivage en 01/A' (Ginisty *et al.*, 1998). Cette particule est composée de 58 protéines. Elle contient 31 protéines ribosomiques de la petite et grande sous-unité ribosomiques¹. Cette particule est également composée de 27 protéines non-ribosomiques, qui sont soit caractérisées comme impliquées dans la biogenèse ribosomique, soit considérées comme potentiellement impliquées dans ce processus de par leur homologies avec les protéines de levure (Takahashi *et al.*, 2003; Yanagida *et al.*, 2001).

Si nous comparons la composition en protéines ribosomiques de la particule 90S décrite ci-dessus avec les données sur l'assemblage des protéines ribosomiques précoces (cf paragraphe III.3), des différences sont observables. En effet, lors de l'immunoprécipitation de la nucléoline (Yanagida *et al.*, 2001), la particule 90S décrite ne comporte pas certaines

¹ : RPS2, RPS3, RPS3a, RPS6, RPS7, RPS9, RPS13, RPS14, RPS15a, RPS16, RPL3, RPL6, RPL7, RPL7a, RPL10, RPL10a, RPL11, RPL13, RPL13a, RPL14, RPL15, RPL16, RPL17, RPL18, RPL18a, RPL21, RPL26, RPL27, RPL27a, RPL30, RPL36

protéines ribosomiques décrites comme s'associant précocement¹. Le fait que la nucléoline intervienne dans le clivage 01/A', donc très précocement dans la biogenèse des ribosomes, pourrait expliquer cette variation entre la description de la composition de la particule 90S et l'assemblage des protéines ribosomiques.

Chez la levure, des complexes de maturation formant le « SSU processome » s'associent au pré-ARNr en cours de transcription. Le premier complexe qui interagit avec le pré-ARNr naissant est le complexe t-UTP (pour « Three Protein complexe required for transcription »), qui est composé de 7 protéines (Utp10p, Nan1p, Utp4p, Utp8p, Utp5p, Utp9p, Utp15p) (Gallagher *et al.*, 2004). L'association du complexe t-UTP est suivie par l'interaction de 4 autres complexes au pré-ARNr en cours de transcription, les complexes UTP-B et UTP-C, la snoRNP U3 et le complexe Mpp10p (pour revue, voir (Henras *et al.*, 2008)). L'association de ces différents complexes au pré-ARNr naissant forme le « SSU processome » (pour « Small SubUnit processome ») (Mougey *et al.*, 1993; Osheim *et al.*, 2004). Récemment, dans des cellules humaines, la protéine 1A6/DRIM, connue pour être régulée négativement dans les cellules de cancers métastatiques du sein, a été définie comme l'orthologue humain d'Utp20p de levure, composant du « SSU processome » (Wang *et al.*, 2007). 1A6/DRIM interagit avec la snoRNP U3 et est nécessaire pour la production de l'ARNr 18S.

Le « SSU processome » est présent dans des cellules humaines sous forme d'un sous-complexe, la snoRNP U3 50S (Turner *et al.*, 2009). Ce sous-complexe est composé du snoARN U3, de la protéine U3-55K, de la nucléoline, de RRP5 et DBP4 mais n'est pas associé aux éléments clés du « SSU processome », c'est-à-dire tUTP10, PWP2, UTP12, BMS1 et MPP10. La snoRNP U3 50S serait un intermédiaire d'assemblage du « SSU processome ». Une transcription active de l'ADNr est nécessaire pour l'interaction de ce

¹ : RPS4, RPS5, RPS11, RPS23, RPS24, RPS27, RPS28, RPL9, RPL12, RPL23a, RPL28, RPL31 et RPL35a

sous-complexe au pré-ARNr en cours de synthèse. Le complexe des protéines tUTP s'associe avec le pré-ARNr en cours de transcription, permettant le recrutement de la snoRNP U3 50S. La nucléoline permettrait l'interaction du snoARN U3 avec l'ETS1. La protéine RRP5/NFBP serait également nécessaire pour l'association de ce sous-complexe au pré-ARN 47S et donc pour la maturation de l'ARNr 18S (Sweet *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2009). DBP4, dont l'orthologue de levure, Dbp4p, est connu pour sa fonction hélicase impliquée dans le relargage du snoARN U14 des pré-ribosomes, déroulerait le pré-ARNr, permettant l'accès à des modifications et à des coupures. La composition de ce sous-complexe est différente de celle du complexe 50S décrit chez les plantes ou chez la levure (Fath *et al.*, 2000; Saez-Vasquez *et al.*, 2004). En effet, dans ces 2 derniers exemples, ce sous-complexe est associé à des facteurs impliqués dans la transcription des gènes ribosomiques et à certains snoARNs comme U14, tandis que chez l'Homme, ni UBF ni les snoARN U14, U17 ou U8 ne sont détectés au sein de ce complexe (Turner *et al.*, 2009). La variation de la composition de ce sous-complexe entre homme et levure souligne là encore les différences de mécanismes de la biogenèse des ribosomes entre ces 2 organismes.

Rrp36 est un facteur pré-ribosomique localisé dans les nucléoles et dans le nucléoplasme (Gerus *et al.*, 2010). L'étude de sa fonction par perte d'expression après traitement par un siARN a révélé que cette protéine est requise pour la biogenèse de la sous-unité 40S. En absence de Rrp36, la quantité de pré-ARNr 41S, 21S et 18S-E diminue alors que celle des pré-ARNr 30S et 26S augmente. Rrp36 est donc requise pour la maturation de l'ETS1 chez l'Homme.

- Particules pré-40S

La composition des particules pré-40S nucléaires humaines n'a pas été encore étudiée. Seule celle des particules pré-40S cytoplasmiques humaines a été décrite récemment grâce à l'immunoprécipitation de la protéine hRio2 (Zemp *et al.*, 2009). Le facteur hRio2 est associé

à la particule pré-40S composée du pré-ARNr 18S-E, de RPS et des facteurs pré-ribosomiques hLtv1, hEnp1, hNob1, hDim2, et hTsr1. La composition de la sous-unité ribosomique pré-40S tardive est comparable à celle décrite chez la levure *S. cerevisiae* (Schäfer *et al.*, 2003).

- Particules pré-60S

L'étude de la fonction d'un facteur pré-ribosomique, la parvuline, a permis d'identifier la composition des particules pré-60S précoces (Fujiyama *et al.*, 2002; Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009). En effet, par des techniques d'immunoprécipitation, il a été montré que la parvuline était associée aux pré-ribosomes du stade particule 90S au stade particules pré-60S (Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009). Les particules ribosomiques pré-60S associées à la parvuline sont composées de 14 protéines ribosomiques et de 13 facteurs pré-ribosomiques : RPL3, RPL6, RPL7, RPL7a, RPL8, RPL10, RPL10a, RPL13a, RPL17, RPL21, RPL26 pour les protéines ribosomiques, et Bop1, la nucléoline, Nop58, NNP-1, Ytm1, DDX24, DDX21, TNZ2 ainsi que d'autres homologues putatifs de facteurs pré-ribosomiques de la particules pré-60S de la levure *S. cerevisiae* (Fujiyama *et al.*, 2002; Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009). La parvuline semble donc impliquée dans la biogenèse de la grande sous-unité, mais malgré la description de son association à la particule en cours de maturation, aucune étude utilisant des techniques de perte de fonction n'a été réalisée afin de déterminer le stade auquel elle est requise.

Quatre-vingt pourcents des facteurs pré-ribosomiques composant ces particules pré-60S présentent des orthologues connus et caractérisés dans la biogenèse des ribosomes chez la levure. Les 20% restants ont également des orthologues chez la levure, mais non caractérisés comme facteurs pré-ribosomiques. Un seul facteur, DHX9, ne présente pas d'orthologue chez *S. cerevisiae* (Fujiyama-Nakamura *et al.*, 2009).

III.6 – Rôles des facteurs pré-ribosomiques au cours de la maturation des ribosomes chez les mammifères

- Facteurs pré-ribosomiques impliqués dans la maturation de la particule ribosomique 40S

De la même manière que pour les protéines ribosomiques, la fonction de facteurs pré-ribosomiques humains a été étudiée par leur perte d'expression. Ces études fonctionnelles ont été menées pour seulement 2 facteurs pré-ribosomiques chez les mammifères : hRio2 et bystine/Enp1 (Adachi *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2007; Rouquette *et al.*, 2005; Zemp *et al.*, 2009). L'étude de la fonction de la bystine a d'abord porté sur son implication dans l'implantation de l'embryon chez les mammifères (Aoki *et al.*, 2006; Fukuda and Nozawa, 1999; Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). Son rôle dans la biogenèse des ribosomes a été étudié quelques années plus tard grâce à son homologie de séquence par rapport à Enp1p de *S. cerevisiae* (Adachi *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2007). hRio2 a été l'un des premiers facteurs pré-ribosomiques étudiés car cette protéine appartient à la famille des kinases RIO. Du fait de cette activité particulière, ce facteur pré-ribosomique pourrait donc jouer un rôle central dans la régulation des associations des facteurs pré-ribosomiques à la particule pré-40S en cours de maturation.

Bystine/Enp1 intervient à un stade intermédiaire de la maturation des particules pré-40S chez la souris et chez l'homme (Adachi *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 2007). C'est une protéine nucléaire qui participe à la maturation de l'ITS1, notamment pour la production du pré-ARNr 18S-E à partir du pré-ARNr 21S. Elle est associée aux particules pré-40S jusque dans le cytoplasme.

hRio2 est une protéine principalement cytoplasmique, mais lorsque l'export nucléocytoplasmique est inhibé, elle s'accumule dans le nucléoplasme (Rouquette *et al.*, 2005). hRio2 intervient à différentes étapes de la maturation de la sous-unité pré-40S. Elle

est nécessaire pour un export nucléocytoplasmique efficace des particules pré-40S. Elle n'est cependant pas essentielle pour cette étape, puisqu'en l'absence de cette protéine, les particules pré-40S peuvent être exportées vers le cytoplasme, même si l'efficacité de l'export est moindre (Rouquette *et al.*, 2005; Zemp *et al.*, 2009). hRio2 intervient principalement lors de la dernière étape de maturation de la particule pré-40S dans le cytoplasme, qui consiste en un clivage du pré-ARNr 18S-E au site 3 et en la dissociation des facteurs pré-ribosomiques de la particule pré-40S. (Rouquette *et al.*, 2005; Zemp *et al.*, 2009). Le rôle précis de hRio2 dans le clivage du pré-ARNr 18S-E reste encore à déterminer. Cependant, plusieurs hypothèses sont envisageables. hRio2 pourrait être à l'origine de la phosphorylation de l'enzyme responsable du clivage endonucléolytique de ce précurseur, ou d'un co-facteur essentiel à l'activité de cette enzyme. Une autre hypothèse quant à la fonction de hRio2 dans le clivage du pré-ARNr 18S-E en ARNr 18S serait que l'activité kinase de hRio2 soit à l'origine d'un changement conformationnel de la particule pré-40S, permettant ainsi le clivage au site 3 (Zemp *et al.*, 2009). D'autre part, hRio2 est impliquée dans le recyclage des facteurs pré-ribosomiques du cytoplasme vers le noyau. La dissociation de ces facteurs est nécessaire pour la maturation finale de la petite sous-unité. Ce processus de libération des facteurs pré-ribosomiques fait intervenir hRio2 à différents niveaux. La présence de hRio2 est nécessaire et suffisante pour la libération de la bystine de la particule pré-40S, tandis que l'activité kinase de hRio2 est indispensable pour la dissociation des autres facteurs pré-ribosomiques, hDim2, hLtv1 et hNob1, de la particule pré-40S (Zemp *et al.*, 2009).

D'autres études portant sur des protéines nucléolaires ont mis en évidence l'implication de nouveaux facteurs dans la biogenèse des ribosomes, comme SURF6 (Romanova *et al.*, 2006). Cependant, si cette étude montre qu'en l'absence de cette protéine chez la souris, la quantité de l'ARNr 18S produit diminue, elle ne précise pas le stade auquel est impliquée cette protéine.

Le rôle de la protéine B23 dans la biogenèse de la petite sous-unité a également été étudié, mais son implication claire dans cette partie de la biogenèse ribosomique reste à démontrer (Lindstrom and Zhang, 2008). B23, également appelée nucléophosmine (NPM), NO38 ou numatine, est une phospho-protéine abondante, dont la localisation est nucléolaire et nucléoplasmique. Elle est impliquée, en plus de la biogenèse des ribosomes, dans de nombreux processus cellulaires, comme la duplication du centrosome (Okuda *et al.*, 2000), le chaperonnage de protéines (Okuwaki *et al.*, 2001) et le contrôle de la transcription (Colombo *et al.*, 2002). Au cours de la biogenèse des ribosomes, B23 pourrait lier les protéines ribosomiques et consolider leur interaction avec les pré-ARNr. En effet, B23 interagit avec des protéines ribosomiques de la petite et de la grande sous-unité ainsi qu'avec des hélicases à ARN. Par ailleurs, B23 et RPS9 forme un complexe stable qui ne nécessite pas la présence d'ARN (Lindstrom and Zhang, 2008). Une hypothèse du rôle de ce complexe serait que B23 pourrait faire la navette entre le cytoplasme et les nucléoles pour lier les protéines ribosomiques néo-synthétisées dans le cytoplasme, ce qui permettrait de les amener aux nucléoles pour qu'elles s'associent aux pré-ribosomes. Une deuxième hypothèse serait que B23 serve de plateforme de stockage ou d'ancrage à RPS9 afin que cette dernière ne s'agrège pas dans les nucléoles avant son association aux pré-ribosomes (Lindstrom and Zhang, 2008). Nous pouvons également faire l'hypothèse que le complexe B23/RPS9 soit impliqué dans un processus autre que la biogenèse des ribosomes, comme le contrôle du stress ribosomique par exemple.

- Facteurs pré-ribosomiques impliqués dans la maturation de la particule ribosomique 60S

L'inactivation fonctionnelle de facteurs tels que Bop1 ou Pes1 a permis de déterminer l'étape à laquelle ces facteurs intervenaient. Bop1 est une protéine nucléolaire à domaine WD40 (Strezoska *et al.*, 2000). Les protéines à domaine WD40 sont connues pour faire partie de larges complexes multiprotéiques. Bop1 pourrait être requise pour réguler des

interactions protéine-protéine et pour la formation et l'activité de RNP nucléolaires. Par ailleurs, elle est nécessaire pour la maturation de l'ITS1, de l'ITS2 et de l'ETS2 (Strezoska *et al.*, 2002). Bop1 est également requise pour l'association d'autres facteurs pré-ribosomique, Pes1 et WDR12, à la sous-unité pré-60S. De la même manière que Bop1, Pes1 et WDR12 sont essentielles pour les clivages et la maturation des ITS1, ITS2 et ETS2 (Holzel *et al.*, 2005; Lapik *et al.*, 2004). Ces 3 protéines forment un complexe, le complexe PeBoW (pour Pes1-Bop1-WDR12) qui pourrait servir de plateforme d'assemblage pour les facteurs intervenant dans la maturation de ces séquences espaceurs (Holzel *et al.*, 2005). La localisation intracellulaire des ces 3 protéines est régulée par l'abondance relative de chacune de ces 3 protéines. Pes1, Bop1 et WDR12 sont instables dans le cytoplasme. Le transport aux nucléoles de Bop1 dépend de son interaction avec Pes1. Lorsque Bop1 est présente en excès dans le cytoplasme, elle interagit avec WDR12 inhibant ainsi le transport de WDR12 dans le noyau. Cependant, une fois dans le nucléole, ces 3 protéines interagissent et forment un complexe stable, qui peut alors jouer son rôle dans la maturation de la grande sous-unité ribosomique (Rohrmoser *et al.*, 2007). Une autre protéine à domaine WD a été décrite comme étant impliquée dans la biogenèse de la grande sous-unité, GRWD1 (Gratenstein *et al.*, 2005). Ce facteur est l'orthologue humain de la protéine Rrb1p de levure, connue pour son implication dans la biogenèse de la sous-unité 60S (Iouk *et al.*, 2001). La protéine GRWD1 co-sédimente avec les particules pré-ribosomiques mais le stade auquel est requise cette protéine n'a pas été étudié plus précisément chez l'homme (Gratenstein *et al.*, 2005).

La formation de la particules 60S met également en jeu le facteur pré-ribosomique Nog1, une protéine de la famille Obg, un sous-groupe de la superfamille des GTPases. Nog1 est impliquée dans la maturation de l'ITS2 et de l'ETS2 (Lapik *et al.*, 2007; Lapik *et al.*, 2007). Chez la souris, une protéine de la famille des DEAD-box, Ddx51, a récemment été mise en évidence comme nécessaire pour la dissociation de la snoRNP U8 des pré-ARNr

(Srivastava *et al.*, 2010). DxdR1 et Nog1 interagissent *in vitro* et dans un système double-hybride, ce qui suggère qu'elles coopèrent dans la biogenèse des ribosomes, notamment pour la dissociation du snoARN U8 (Srivastava *et al.*, 2010).

Un nouveau facteur pré-ribosomique a été décrit grâce aux études de protéomique du nucléole, qui ont mis en évidence de nombreuses protéines aux rôles inconnus (Andersen *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2005; Scherl *et al.*, 2002; Vollmer *et al.*, 2006). Les analyses bioinformatiques des différences résultats de protéomique ont mené à la classification en plusieurs groupes de ces protéines nucléolaires en fonction de leur rôle putatif. Ainsi, près de 170 protéines nucléolaires ont été regroupées selon leur fonction potentielle ou prouvée dans la biogenèse des ribosomes (Coute *et al.*, 2006). L'étude d'une protéine appartenant à ce groupe, ISG20L2, a décrit la fonction exonucléase 3'-5' de ce facteur et son rôle dans la biogenèse des ribosomes (Coute *et al.*, 2008). ISG20L2 est associé à des protéines ribosomiques de la grande sous-unité, RPL4, RPL6, RPL7a, RPL7, RPL8, RPL10a, RPL18, RPL21, RPL27 et RPL31, et à des facteurs pré-ribosomiques, la nucléoline et B23. En absence de ISG20L2, la voie de maturation des ARNr de la sous-unité 60S est défectueuse. En effet, la maturation du pré-ARNr 12S est bloquée et cet intermédiaire s'accumule dans les cellules HeLa n'exprimant pas ISG20L2 (Coute *et al.*, 2008). Par ailleurs, lorsque cette protéine est sur-exprimée dans des cellules humaines, le pré-ARNr 12S disparaît rapidement tandis qu'un nouvel intermédiaire de maturation de la voie de l'ARNr 5,8S s'accumule. ISG20L2 pourrait donc être une exonucléase requise pour la maturation du 12S en 5,8S ou bien être un facteur régulateur de cette étape de maturation, puisque sa sur-expression augmente la cinétique de maturation.

La protéine B23 joue également un rôle dans la biogenèse de la grande sous-unité. En effet, en plus de son implication dans la maturation de la sous-unité 40S, elle est requise pour les clivages au sein de l'ITS2 et donc pour la production du 28S et du 5,8S (Huang *et al.*, 2005; Itahana *et al.*, 2003; Savkur and Olson, 1998). En outre, elle interagit avec

certaines protéines ribosomiques de la grande sous-unité, c'est-à-dire RPL7, RPL7a, RPL8, RPL11, RPL12, RPL18, RPL21, RPL26 et RPL28 (Lindstrom and Zhang, 2008). Des études *in vitro* sur la fonction de ribonucléase de B23 ont révélé que cette protéine clive l'ITS2 environ 250 nt après l'extrémité 3' du 5,8S (Savkur and Olson, 1998). Ce rôle d'endonucléase de B23 est spécifique de la voie de maturation de la grande sous-unité car cette fonction n'est pas requise pour les clivages qui ont lieu au sein de l'ETS1 et de l'ITS1. L'implication de B23 dans la maturation de l'ITS2, permettant de séparer les précurseurs du 5,8S et du 28S, a été confirmée par la perte d'expression de B23 par siARN (Itahana *et al.*, 2003). L'analyse des pré-ARNr par des expériences de chasse (« pulse-chase ») montre qu'en absence de cette protéine, la quantité de pré-ARNr 32S augmente alors que la quantité d'ARNr 28S nouvellement produit diminue fortement. Cette analyse témoigne de l'implication de B23 pour le clivage au site 3' au sein de l'ITS2, mais ne confirme pas que cette coupure est réalisée par cette protéine (Itahana *et al.*, 2003). En effet, aucune étude du site catalytique de B23 n'a été réalisée *in vivo* pour déterminer si cette protéine correspond bien à l'endonucléase impliquée dans le clivage au site 3'. Par ailleurs, l'activité de B23 serait modulée par l'action de ARF. ARF est une protéine nucléolaire qui régule l'activité de p53. Cette régulation se fait par la liaison de ARF à MDM2, ce qui inhibe l'activité E3 ligase de cette dernière. L'inhibition de cette activité E3 ubiquitine ligase de MDM2 stabilise et active ainsi p53. Leur liaison entraîne la polyubiquitination de B23, ce qui conduit à sa dégradation. La perte de B23 cause une diminution de la transcription et donc une réduction de la quantité du pré-ARNr 47S ainsi qu'un arrêt de la maturation de la particule pré-60S (Huang *et al.*, 2005; Itahana *et al.*, 2003; Murano *et al.*, 2008).

Le rôle dans la biogenèse des ribosomes de la protéine SBDS a été étudié car le gène codant cette protéine est muté chez les patients atteints du syndrome de Schwachman-Diamond (Ganapathi *et al.*, 2007). SBDS présente une localisation nucléolaire et cytoplasmique. Des expériences d'immunoprécipitation montrent que SBDS interagit

spécifiquement avec B23, de manière indépendante de l'ARN. Cependant, la perte d'expression de B23 n'affecte pas la localisation de SBDS, comme cela est le cas pour RPS9 en absence de B23. Le complexe B23/SBDS pourrait donc être impliquée dans une autre voie que celle de la biogenèse des ribosomes, mais ceci reste à démontrer. Lorsque l'expression de SBDS est inhibée par un siARN dirigé contre l'ARNm codant cette protéine, la production globale des ARNr est significativement diminuée, mais aucun défaut spécifique d'une étape de maturation n'est observable. D'autre part, SBDS interagit avec l'ARNr 28S et co-sédimente uniquement avec les particules 60S lors d'expériences de gradient de saccharose. SBDS semble donc impliquée dans la maturation de la sous-unité 60S dans les cellules de mammifères, mais pas directement dans la maturation des ARNr puisqu'en absence de SBDS, aucune étape précise n'est bloquée (Ganapathi *et al.*, 2007). Elle semble donc requise, en plus de son rôle dans la transcription, pour l'étape la plus tardive de maturation des particules pré-60S. SBDS pourrait également contrôler l'association de la sous-unité 60S, tant que celle-ci n'est pas mature, à la sous-unité 40S lors de l'initiation de la traduction. L'étude menée sur la fonction de l'orthologue de levure de SBDS, la protéine Sdo1p, a permis de préciser le rôle de cette protéine au sein de la biogenèse de la grande sous-unité (Menne *et al.*, 2007). Sdo1p est requise pour l'étape cytoplasmique de la maturation de la particule pré-60S. Sdo1p s'associe aux particules pré-60S dans le cytoplasme, suivi de l'association de Elf1p. Sdo1p et Elf1p permettraient, par une action concertée, de détacher le facteur Tif6p de manière GTP-dépendante de la particule pré-60S (Menne *et al.*, 2007). La dissociation de Tif6p activerait la compétence traductionnelle de la sous-unité 60S naissante, en permettant son interaction avec la particule 40S et donc la formation du ribosome 80S.

III.7 – Export nucléocytoplasmique des particules pré-ribosomiques

Les particules pré-ribosomiques immatures sont transportées du nucléole vers le cytoplasme où leur maturation sera achevée. Les premières preuves d'un transport actif des particules ribosomiques ont été décrites à la fin du XX^{ème} siècle. Les études ont montré que ce transport était unidirectionnel, coopératif entre la petite et la grande sous-unité et qu'il nécessitait de l'énergie (Bataille *et al.*, 1990; Khanna-Gupta and Ware, 1989). Toutefois, ces études ont été réalisées en micro-injectant des particules ribosomiques matures dans des noyaux d'ovocyte de xénope, contrairement au transport nucléoplasmique impliqué dans la biogenèse des ribosomes qui véhicule des particules pré-ribosomiques immatures.

Tout comme l'assemblage et la maturation des particules pré-ribosomiques, l'étude du transport nucléocytoplasmique des pré-ribosomes a été réalisée en grande partie chez *S. cerevisiae*. Toutefois, quelques études ont permis de déterminer la nécessité de protéines ribosomiques, de facteurs pré-ribosomiques et d'exportines chez les mammifères (Rouquette *et al.*, 2005; Thomas and Kutay, 2003; Trotta *et al.*, 2003). Ainsi, l'export des particules pré-40S et pré-60S dépend de l'exportine CRM1 et de RanGTP (Thomas and Kutay, 2003). Les sous-unités pré-60S se lient à hNmd3, une protéine adaptatrice pour l'export dépendant de Crm1-RanGTP (Trotta *et al.*, 2003). En ce qui concerne les pré-ribosomes 40S, l'adaptateur impliqué dans leur transport vers le cytoplasme n'a pas été décrit à ce jour. Cependant, il a été montré que cette étape de la maturation était dépendante de la protéine ribosomique RPS15 et faisait intervenir Crm1 (Rouquette *et al.*, 2005; Thomas and Kutay, 2003). Des résultats présentés en congrès par U. Kutay décrivent le rôle d'une exportine, EXP5, dans l'export des particules pré-40S. En effet, cette protéine se lierait à la particule pré-40S de manière dépendante à RAN-GTP et serait requise pour l'export efficace de cette particule. La protéine B23/NPM semble impliquée dans le contrôle de l'export des particules pré-40S et pré-60S (Maggi *et al.*, 2008). Lorsque la fonction de navette de B23 est inhibée par mutation de sa séquence de liaison à Crm1, les particules pré-40S et pré-60S s'accumulent dans le

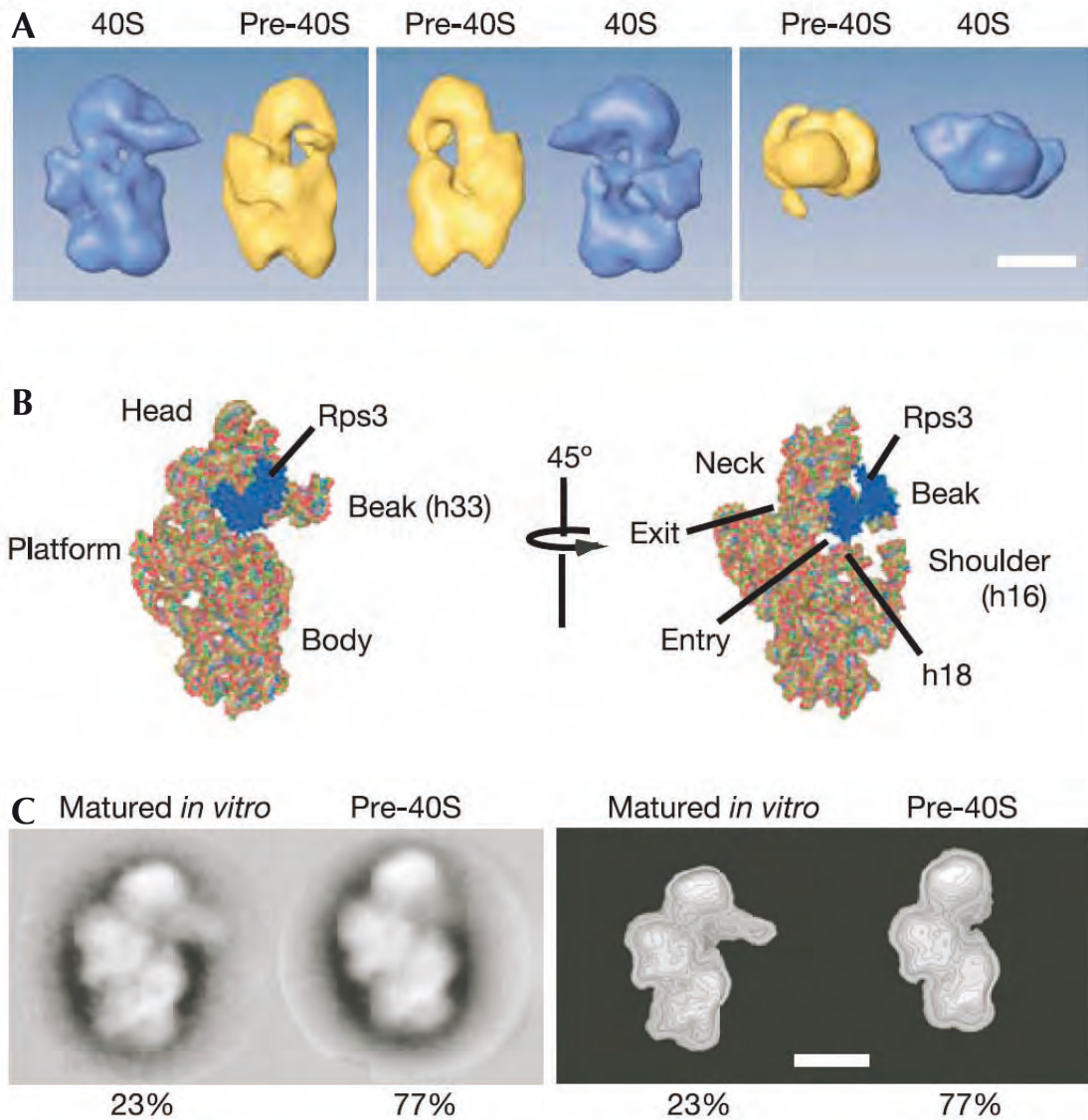


Figure 24 : Modification de la structure de la particule pré-40S par Hrr25p pour son passage à travers le pore nucléaire.

(A) Reconstruction 3D des particules ribosomiques matures ou pré-40S. Vues latérales (à gauche et au centre) et vue du dessus (à droite). Barre d'échelle = 10 nm (B) Structure tertiaire du 18S de levure et superposition de Rps3p. (C) Développement de la structure du bec à partir de particules pré-40S isolées. Barre d'échelle = 10 nm

D'après Schäfer et al., 2006.

nucléoplasme, et les cellules ont une croissance ralentie. Par ailleurs, lorsque B23 est sur-exprimée, la production protéique est augmentée. Le rôle de B23/NPM dans la régulation de l'export des particules pré-ribosomiques constitue donc un processus fondamental pour la régulation de la croissance cellulaire (Maggi *et al.*, 2008).

Bien que je m'attache dans le document présent à décrire la biogenèse des ribosomes chez les mammifères, les études menées chez la levure décrivent des moments-clefs de ce mécanisme d'export nucléocytoplasmique, notamment en ce qui concerne la petite sous-unité. Tout comme chez les mammifères, l'export des pré-ribosomes chez *S. cerevisiae* est dépendant de l'exportine Xpo1p/Crm1p (Gadal *et al.*, 2001b; Ho *et al.*, 2000; Moy and Silver, 1999). L'interaction entre la particule pré-60S et l'exportine Crm1p est établie grâce au facteur Nmd3p. Cette protéine présente 2 signaux importants, une séquence NES (pour « Nuclear Export Signal ») et une séquence NLS (pour « Nuclear Localisation Signal ») (Gadal *et al.*, 2001b; Ho *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres facteurs tels que Mtr2p, Rix7p, et Tif6p ont été décrits comme étant associés à la particule pré-60S et seraient impliqués dans le transport nucléocytoplasmique de ces particules (Gadal *et al.*, 2001a; Gadal *et al.*, 2001b; Nissan *et al.*, 2002; Senger *et al.*, 2001). La protéine Rrp12p est quant à elle nécessaire au transport des 2 sous-unités immatures (Oeffinger *et al.*, 2004). Rrp12p est une protéine à domaine HEAT, un motif souvent retrouvé dans des facteurs d'export comme les caryophérines β . Un des rôles possibles de ces domaines HEAT est d'interagir avec les domaines hydrophobes des nucléoporines, ce qui permettrait de faire passer les particules pré-ribosomiques à travers les pores nucléaires (Oeffinger *et al.*, 2004). L'export vers le cytoplasme des particules pré-40S est également dépendant de l'exportine Crm1p mais aucune protéine adaptatrice comme Nmd3p n'a été décrite pour cette sous-unité. Une protéine à domaine HEAT, Hrr25p, aurait un rôle particulier lors de cette étape. Cette protéine présente une activité kinase qui permettrait de décrocher Ltv1p et RPS3 de la

particule pré-40S, ce qui changerait la structure du bec de la particule pré-40S et faciliterait ainsi son passage à travers le pore (Figure 24) (Schäfer *et al.*, 2006).



Diamond Blackfan Anemia



Dyskeratosis Congenita



Treacher Collins

Figure 25 : Symptômes de ribosomopathies comme l'anémie de Diamond-Blackfan, la dyskératose congénitale et le syndrome de Treacher Collins.

(A) Le symptôme principal de l'ADB est une anémie macrocytaire. En plus de ce défaut hématologique, les malades peuvent présenter différents symptômes physiques, tels qu'un écartement des 2 yeux importants, une micrognathie (c'est à dire un menton petit) ou un pouce tri-phalangé. (B) Les symptômes physiques de la dyskératose congénitale peuvent être des ulcérations buccales, des défauts de pigmentation de la peau, notamment au niveau de la nuque et du tronc, et une dystrophie des ongles. (C) Malformations cranio-faciales, notamment au niveau des maxillaires supérieurs et inférieurs, ainsi qu'au niveau des oreilles, observées chez des patients atteints du syndrome de Treacher-Collins. D'après Narla et al., 2010.

B – ANOMALIES DE LA MATURATION DES RIBOSOMES ET PATHOLOGIES

Les ribosomopathies, ou maladies liées aux ribosomes, rassemblent des pathologies diverses dans lesquelles des mutations génétiques entraînent des défauts de la biogenèse ribosomique et de fonction des ribosomes, dont il résulte des phénotypes cliniques spécifiques. Des anomalies dans la fonction des ribosomes sont impliquées dans la tumorigenèse chez l'homme. La voie p53 représente un mécanisme de surveillance pour la traduction des protéines aussi bien que pour l'intégrité génomique. Des travaux de plus en plus nombreux démontrent que cette voie est activée lors de défauts dans la biogenèse des ribosomes.

Les ribosomopathies se composent du syndrome 5q- et de maladies rares, qui sont l'Anémie de Diamond-Blackfan, le syndrome de Schwachman-Diamond, la dyskératose congénitale liée à l'X, le syndrome de Treacher Collins et la chondrodysplasie métaphysaire de McKusick, aussi nommé hypoplasie cartilage-cheveux (Figure 25).

I – Anémie de Diamond-Blackfan (ou ADB)

L'anémie de Diamond-Blackfan est une maladie congénitale. La maladie se caractérise par une anémie macrocytaire, une réticulocytopénie et une diminution sélective de précurseurs érythropoïétiques dans la moelle osseuse. L'incidence de cette maladie est de 5 à 7 malades pour 1 million de naissances. Les patients présentent des phénotypes variés comme un pouce tri-phalangé, une taille réduite, des malformations osseuses, une pâleur de la peau ou encore des défauts cardiaques ou rénaux (Figure 25) (Lipton and Ellis, 2009).

La première mutation touchant un gène associé à cette maladie a été identifiée dans celui codant la protéine ribosomique RPS19 (Draptchinskaia *et al.*, 1999). Cette protéine est mutée chez $\approx 25\%$ des patients (Choemmel *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2003). Par la suite, des mutations associées à la maladie ont été décelées dans d'autres gènes codant des protéines ribosomiques de la sous-unité 40S ou 60S. Il s'agit de RPS7, RPS15, RPS17, RPS24 et RPS27a pour les protéines de la petite sous-unité, et de RPL5, RPL11, RPL35a, RPL36 pour les protéines de la grande sous-unité (Choemmel *et al.*, 2008; Cmejla *et al.*, 2007;

Cmejla *et al.*, 2009; Doherty *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2008; Gazda and Sieff, 2006; Gazda *et al.*, 2008).

Malgré la connaissance des gènes mutés chez près de 50% des patients, le lien entre défaut de la biogenèse ribosomique et la pathologie n'est pas élucidé. Actuellement, deux hypothèses sont envisageables: la première est axée sur les fonctions extra-ribosomiques des RPS et RPL et met en cause l'activation de l'apoptose via la voie p53 ; la deuxième hypothèse propose que l'haploinsuffisance d'une protéine ribosomique entraînerait un défaut quantitatif de ribosomes matures, qui serait létal pour les érythrocytes du fait de leur particularité de cellules anucléées.

II – Syndrome de Schwachman-Diamond (ou SDS)

Le SDS est une maladie autosomale récessive dont l'incidence est estimée à 1 pour 50 000 naissances. Cette pathologie est caractérisée par une insuffisance exocrine pancréatique, une hématopoïèse inefficace et un risque accru de leucémie. D'autres signes incluant des anémies, des thrombocytopénies, des infections dues à une neutropénie, une petite taille et des anomalies du squelette sont également observables selon les patients.

Environ 90% des patients présentent une mutation bi-allélique du gène SBDS (Boocock *et al.*, 2003). La fonction précise de cette protéine n'est pas connue, mais un certain nombre d'éléments permettent d'envisager son implication dans la biogenèse des ribosomes et dans la maturation des ARNr (Ganapathi *et al.*, 2007). Dans les cellules de patients, les ARNm de certaines protéines ont une expression anormale, notamment les ARNm des protéines ribosomiques RPS9, RPS20, RPL6, RPL15, RPL22, RPL23 et RPL29 (Rujkijyanont *et al.*, 2009). Cependant, bien que SBDS soit impliquée dans la biogenèse des ribosomes, c'est une protéine multifonctionnelle, intervenant notamment dans la stabilisation des fuseaux mitotiques ce qui peut laisser supposer un rôle dans la prolifération et/ou la ségrégation des chromosomes (Austin *et al.*, 2008; Orelia *et al.*, 2009).

III – Syndrome 5q-

Les patients atteints de ce syndrome présentent une délétion au niveau du bras du chromosome 5. Ils ont une anémie macrocytaire, souvent associée à une hausse du nombre de plaquettes avec des micromégakaryocytes hypolobulés. La délétion de cette partie du chromosome a pour conséquence l'haploinsuffisance de RPS14 dont le gène est situé au niveau de la délétion (Ebert *et al.*, 2008; Pellagatti *et al.*, 2008).

IV – Dyskératose congénitale liée à l'X

La prévalence de cette maladie est de 1 pour 1 million de naissance. La dyskératose congénitale est une maladie héréditaire polymorphe sur le plan clinique. Les symptômes regroupent des troubles de pigmentation de la peau, une dystrophie des ongles, des ulcérations buccales ainsi que des problèmes de production des globules rouges et plaquettes lors de l'hématopoïèse (Figure 25).

Les mutations responsables de cette maladie affectent les gènes codant les composants du complexe de la télomérase, notamment le gène *DKC1* qui code la dyskérine. Ce facteur est une protéine nucléolaire associée à des snoRNP à boîte H/ACA et est la pseudo-uridylyl synthase impliquées dans les modifications post-transcriptionnelles des ARNr (Heiss *et al.*, 1998). La caractéristique commune entre tous les patients atteints de la dyskératose congénitale est de présenter des télomères courts, notamment dans leurs cellules leucocytaires (Alter *et al.*, 2007; Vulliamy *et al.*, 2001). Cependant, un raccourcissement des télomères est également présent chez des malades atteints d'autres pathologies (Blasco, 2007; Savage and Alter, 2008). Ce phénotype ne doit donc pas être la seule cause des développements de symptômes spécifiques à cette maladie. La combinaison des défauts dans la longueur des télomères et des défauts de biogenèse des ribosomes pourrait donc être à l'origine des symptômes spécifiques à cette pathologie.

V - Chondrodysplasie métaphysaire de McKusick ou hypoplasie cartilage-cheveux

Cette maladie a une incidence élevée dans les populations finlandaises et amish, avec respectivement une prévalence de 1 pour 1 300 et de 1 pour 20 000 naissances. Cette maladie se traduit par des dysfonctionnements du système immunitaire et une augmentation de la prédisposition à des cancers, notamment des lymphomes non Hodgkiniens et des carcinomes des cellules basales (Ganapathi and Shimamura, 2008). La mutation responsable de cette maladie a été localisée dans le gène *RMRP* qui code l'ARN qui compose le complexe RNase MRP, une snoRNP impliquée à plusieurs étapes de la biogenèse des ribosomes (Welting *et al.*, 2004).

VI – Syndrome de Treacher-Collins ou TCS

Les malades atteints de cette pathologie présentent des déformations cranio-faciales (Figure 25). La prévalence de cette maladie est de 1 pour 50 000 naissances (Posnick and Ruiz, 2000). Le gène responsable de la TCS est le gène *TCOF1* codant la protéine « treacle » ou Tcof1 (Sakai and Trainor, 2009). Cette protéine colocalise avec le facteur de transcription UBF dans le nucléole et est associée à ce facteur lors d'expériences d'immunoprécipitation. Lorsque les différents sous-domaines nucléolaires sont ségrégués par un traitement avec de faible dose d'ActD, Tcof1 colocalise partiellement avec UBF dans les FC mais présente également une localisation dans le GC (Valdez *et al.*, 2004). Par ailleurs, Tcof1 interagit également avec Nop56, un des composants des snoRNP à boîte C/D (Hayano *et al.*, 2003). Tcof1 semble donc essentielle pour la transcription de l'ADN ribosomique et pourrait également jouer un rôle dans la méthylation des ARNr.

Des souris haploinsuffisantes pour Tcof1 présentent une diminution de la production des ribosomes corrélée à une baisse de la prolifération des cellules de la crête neurale et de l'ectoderme neural (Dixon *et al.*, 2006). L'inhibition chimique ou génétique de p53 dans ces

souris transgéniques permet de prévenir les malformations cranio-faciales (Jones *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les malformations cranio-faciales observées chez les malades atteints de TCS sont très similaires à celles observées chez des malades atteints de la DBA, suggérant une implication forte des ribosomes dans ces physiopathologies. Cependant, aucune anémie ou défaut hématopoïétique n'est observée chez des malades TCS. La dissonance entre la similarité des malformations entre ces 2 maladies et la différence au niveau des affections hématopoïétiques accroît la nécessité de comprendre la spécificité des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans chacune de ces ribosomopathies.

VII – Tumorigenèse et biogenèse des ribosomes

Une des questions majeures actuelles est de savoir si une perturbation dans le processus normal de la production des ribosomes peut induire ou contribuer à la tumorigenèse. Les ribosomes ont un rôle central dans la traduction des ARNm en protéines. Il est aujourd'hui connu que des dérégulations dans la traduction d'ARNm sont impliquées dans la formation de tumeurs (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990). Par ailleurs, des études de mutagenèse chez le poisson-zèbre ont permis de déterminer 12 lignées présentant un développement de tumeurs. Parmi ces 12 lignées, 11 ont des mutations dans des gènes codant des protéines ribosomiques¹ (Amsterdam *et al.*, 2004).

Ces différentes observations permettent d'émettre assez facilement l'hypothèse que des anomalies menant à la production de ribosomes défectueux puissent également être une source de formation de tumeurs. Ces mécanismes de tumorigenèse sont soutenus par la description de l'augmentation de l'incidence de tumeurs chez des souris dont le gène *DKC1* est muté. La dyskérine présente une fonction à la fois dans la biogenèse des ribosomes et

¹ : RPS7, RPS8, RPS15a, RPS18, RPS29, RPL7, RPL13, RPL23a, RPL35, RPL36 et RPL36a

dans le contrôle de la longueur des télomères (Blasco *et al.*, 1997; Ruggero *et al.*, 2003). La double fonctionnalité de cette protéine met en évidence une corrélation entre biogenèse des ribosomes et contrôle de la prolifération cellulaire. D'autre part, une étude récente a décrit un lien entre l'altération de la production des ribosomes, la capacité traductionnel et la progression tumorale dans les cancers du sein chez l'homme (Belin *et al.*, 2009). Cette étude montre que la synthèse du pré-ARNr 45S est augmentée dans les cellules présentant une agressivité tumorale accrue, et que le couplage entre les clivages aux sites A0 et 1 de l'ETS1 est différent que dans des cellules contrôles, puisque le pré-ARNr 43S s'accumule. Par ailleurs, ce défaut de maturation est associé à une baisse de l'efficacité de la traduction IRES-dépendante, notamment de l'ARNm codant p53. L'augmentation de l'agressivité tumorale serait donc associée à des altérations qualitatives de la biogenèse des ribosomes, menant à une traduction variable selon le type d'ARNm.

Les liens décrits ces dernières années entre la biogenèse des ribosomes, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose sont donc essentiels à approfondir. L'étude du processus normal de biogenèse des ribosomes chez les mammifères est centrale afin d'étendre nos connaissances des spécificités de ces mécanismes, chez l'homme en particulier.

La compréhension d'un tel processus permettrait en outre d'envisager l'étude du contrôle qualité mis en jeu lors de la biogenèse des ribosomes, ainsi que l'étude des différentes voies de régulation qui en découlent, tant au niveau du processus de traduction que du contrôle du cycle cellulaire. En effet, lors de la mitose, les régulations mises en œuvre pour l'inhibition de la transcription ainsi que pour l'arrêt de la maturation des pré-ARNr restent des domaines encore vastes à étudier.

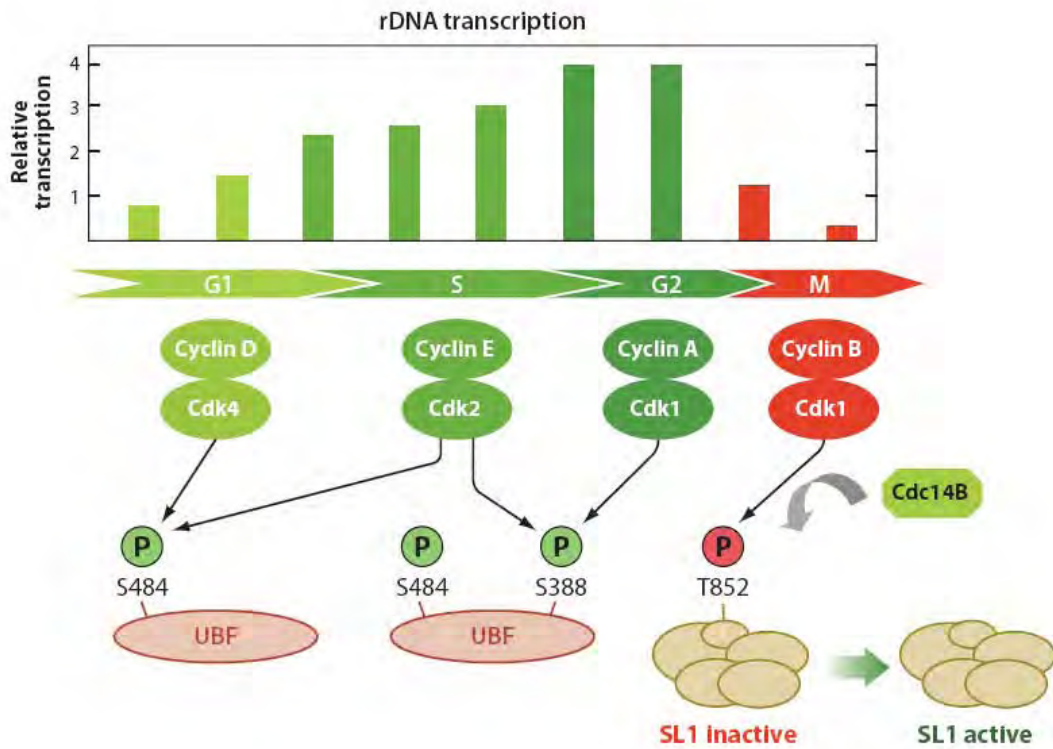


Figure 26 : Régulation de la transcription par l'ARN pol I pendant la progression dans le cycle cellulaire

UBF est activé durant l'interphase par des phosphorylations par les complexes Cdk4/cyclineD, Cdk2/cyclineE et Cdk2/cyclineA. Au début de la mitose, UBF est déphosphorylé, puis le complexe Cdk1/cyclineB rajoute un phosphate sur la thréonine 852, entraînant l'inactivation de SL1. En sortie de mitose, la déphosphorylation de SL1 réactive ce facteur ce qui permet la réactivation de la transcription.

D'après Drygin et al., 2010.

C – NUCLEOLE ET BIOGENÈSE DES RIBOSOMES PENDANT LA MITOSE

La mitose est une phase critique du cycle cellulaire au cours de laquelle la plupart des grands processus, comme la biogenèse des ribosomes, sont arrêtés. Les machineries de synthèse et de maturation des ARNr sont inactivées en fin de prophase. Ceci conduit à la disparition progressive des nucléoles dont les constituants sont, pour la plupart, dispersés dans l'espace cytosolique. La transcription de l'ADNr et la maturation des particules pré-ribosomiques sont ensuite réactivées en fin de télophase, au moment de la séparation des cellules filles et concomitamment à la reformation du noyau.

I – Contrôle de la transcription de l'ADNr pendant le cycle

La transcription des gènes ribosomiques est maximale en phase S et G2, silencieuse lors de la mitose pour ensuite être progressivement réactivée en G1 (Figure 26). Les phénomènes d'inhibition et de réactivation de la transcription de l'ARN pol I sont régulés par des cycles de phosphorylations-déphosphorylations contrôlés par les complexes cycline/CDKs spécifiques de chaque phase du cycle cellulaire.

I.1 – Inhibition de l'activité ARN pol I

La transcription par l'ARN pol I est mise en silence par la phosphorylation réversible du complexe SL1, via TBP et TAF₁₁₀, et du facteur de terminaison TTF1 par le complexe CDK1-cycline B (Heix *et al.*, 1998; Sirri *et al.*, 1999). La phosphorylation en prométaphase de SL1 entraîne une inhibition de son interaction avec UBF (Heix *et al.*, 1998). L'activité du complexe CDK1-cycline B est nécessaire pour inhiber l'activité de l'ARN pol I de la prométaphase à la télophase (Figure 27) (Sirri *et al.*, 2000). En effet, si l'activité kinase de ce complexe est inhibée par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques du complexe CDK1-cyclineB comme la roscovitine, alors l'activité transcriptionnelle de l'ARN pol I peut être réactivée

pendant la mitose. Néanmoins, bien que la transcription par l'ARN pol I produise le pré-ARNr 47S en présence de roscovitine, ce précurseur n'est pas maturé et donc s'accumule jusqu'à la reprise normale de la maturation en fin de la mitose (Sirri *et al.*, 2000). La reprise de la synthèse des ARNr est donc dépendante de l'inhibition de l'activité du complexe CDK1/cycline B qui a lieu en fin de mitose.

La répression de l'activité transcriptionnelle est également due à la phosphorylation d'une histone désacétylase de classe III, SIRT7. Pendant l'interphase, la transcription par l'ARN pol I est régulée positivement par SIRT7, qui s'associe avec l'ARN pol I (Ford *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré que SIRT7 interagissait directement avec le facteur de transcription UBF dans des cellules interphasiques (Grob *et al.*, 2009). Lors de la mitose, SIRT7 est phosphorylée par le complexe CDK1/cycline B. Ceci modifie la conformation de la partie C-terminale de l'histone désacétylase qui ne peut plus s'associer à la machinerie transcriptionnelle de pol I, ce qui marque l'inhibition de la transcription (Grob *et al.*, 2009).

Pendant cette période de mise en silence, certains composants de la machinerie de transcription des gènes ribosomiques, comme UBF et certaines sous-unités de l'ARN pol I, restent associés entre eux sous une forme inactivée aux niveaux des NORs (Roussel *et al.*, 1996; Sirri *et al.*, 1999; Zatsepina *et al.*, 1993). La persistance des différents acteurs de la synthèse de l'ARNr au niveau des gènes d'ADNr permettrait de les partager de manière équivalente entre les deux cellules filles, mais assurerait également une meilleure efficacité de la reprise de la transcription dans les nucléoles nouvellement formés dans les cellules filles. Seules quelques sous-unités de l'ARN pol I, c'est-à-dire RPA16, RPA39 et RPA194, se dissocient transitoirement des NORs durant la métaphase, pour s'y réassocier en anaphase (Chen *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2004)

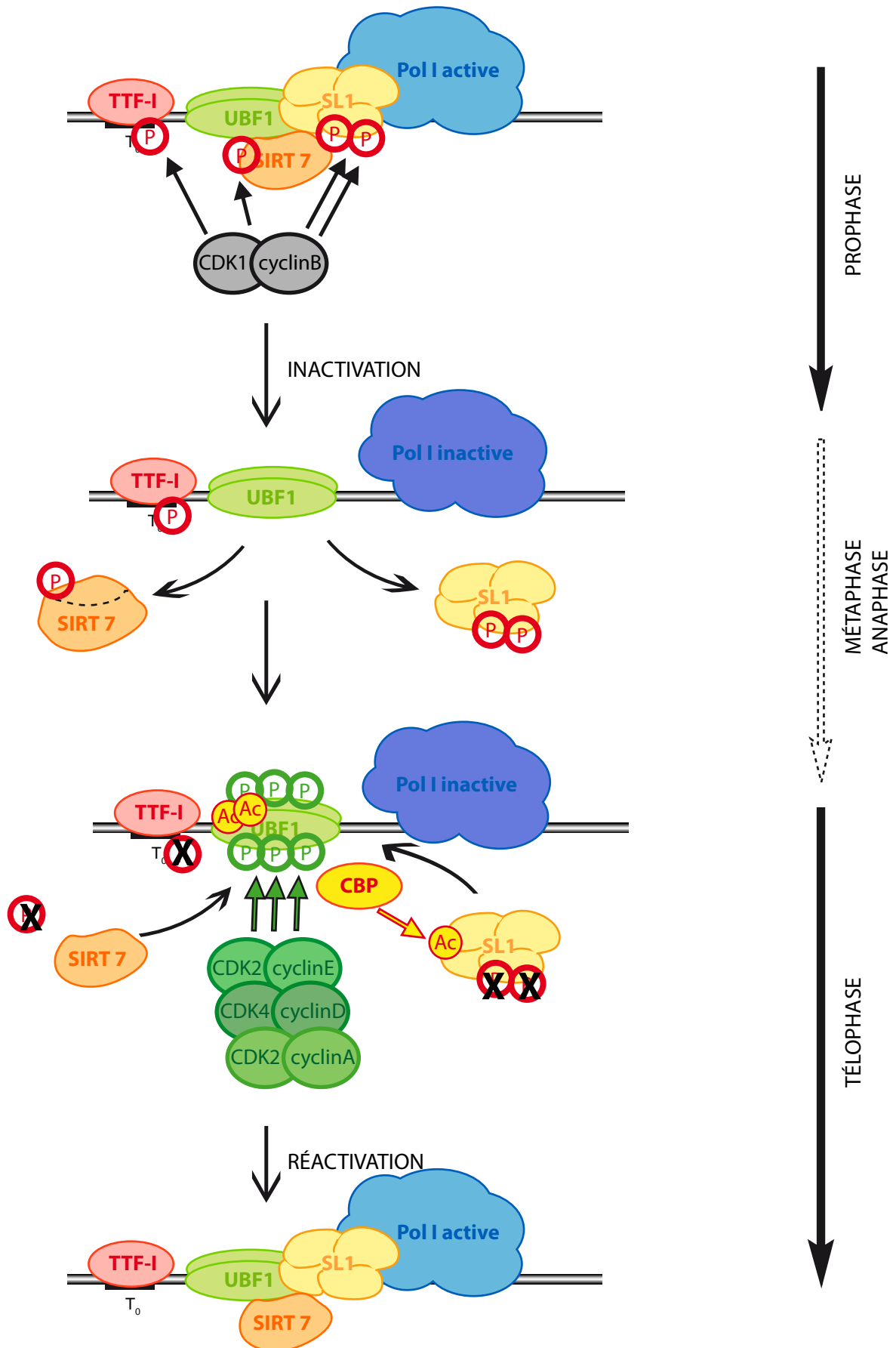


Figure 27 : Régulation de l'activité transcriptionnelle pendant la mitose.

En prophase, la transcription est inactivée par le complexe Cdk1/cyclineB, qui phosphoryle SL1, SIRT7 et TTF-I . Ces modifications entraînent la dissociation de ces facteurs lors de la métaphase et de l'anaphase. En début de télophase, SL1, SIRT7 et TTF-I sont déphosphorylés sur ces sites, SL1 est acétylé par CBP tandis que les complexes Cdk2/cyclineE ou A et Cdk4/cyclineD phosphorylent UBF, ce qui rend à nouveau actif le complexe de transcription.

I.2 – Réactivation de la transcription en fin de mitose

Dans les cellules humaines, la reprise de la transcription des gènes ribosomiques se fait en début de télophase. Il est possible que la déphosphorylation des sites phosphorylés spécifiquement par le complexe CDK1/cycline B sur les facteurs UBF et de SL1 soit nécessaire pour réactiver la transcription des gènes ribosomiques (Kuhn *et al.*, 1998; Sirri *et al.*, 2000). Néanmoins, l'activation de la synthèse du pre-ARNr 47S nécessite différentes modifications d'UBF, comme des phosphorylations par des complexes cycline/kinases spécifiques de la phase G1, mais également l'acétylation de résidus précis d'UBF et de SL1.

UBF est phosphorylé par la CDK4/cycline D à partir de la télophase, puis, lors de la progression jusqu'en G1, UBF est phosphorylé par la CDK4/cycline D et la CDK2/cycline E sur la sérine en position 484, et par CDK2/cycline E et CDK2/cycline A sur la sérine 388 (Figure 27). Ces modifications augmentent son activité et donc la transcription par l'ARN pol I (Voit and Grummt, 2001; Voit *et al.*, 1999). L'histone acétyltransférase CBP (« CREB-Binding Protein ») active aussi la synthèse des ARNr (Pelletier *et al.*, 2000). La formation d'un complexe UBF/CBP activerait la transcription en acétylant UBF, mais également par l'acétylation des histones de la chromatine adjacente. Ces modifications permettraient l'ouverture de la chromatine, et augmenterait l'association d'UBF aux gènes ribosomiques, ce qui aurait pour conséquence une suractivation de la transcription. D'autre part, SIRT7, qui interagit directement avec UBF, doit être présent et déphosphorylé en fin de mitose pour une bonne reprise de la transcription des gènes ribosomiques (Grob *et al.*, 2009).

L'acétylation de SL1 augmente le niveau de transcription par l'ARN pol I. L'histone acétyl-transférase PCAF (pour « p300/CBP Associated-Factor ») interagit avec TTF-1 qui se lie à l'élément terminateur présent en amont des gènes d'ARNr. La présence de PCAF à proximité du promoteur de l'ADNr permettrait l'acétylation de SL1, augmentant ainsi sa capacité pour interagir à l'ADN, ce qui stimulerait la transcription par l'ARN pol I (Muth *et al.*, 2001). La désacétylation de SL1 par un orthologue humain de Sir2p de la levure *S.*

cerevisiae a pour conséquence une répression de la synthèse des ARNr (Muth *et al.*, 2001). Cette observation soutient l'hypothèse selon laquelle l'acétylation de SL1 serait nécessaire pour l'activation de la transcription des gènes ribosomiques.

II – Quel comportement des composants nucléolaires pendant la mitose ?

À partir de la prométaphase, l'arrêt de la maturation des particules pré-ribosomiques ainsi que le désassemblage des nucléoles a pour conséquence une relocalisation des facteurs pré-ribosomiques et des protéines nucléolaires. Les différents composants du nucléole n'adoptent pas tous le même comportement au cours de la phase M.

II.1 – Désassemblage des nucléoles en début de mitose

En prométaphase, lorsque la répression de la transcription des gènes ribosomiques débute, les composants du DFC et GC se dispersent progressivement dans le cytosol. Lors de la transition prométaphase/métaphase, certaines de ces protéines, actrices de la maturation ribosomique, vont en partie former une gaine autour des chromosomes (Angelier *et al.*, 2005; Hernandez-Verdun and Gautier, 1994; Savino *et al.*, 2001; Weisenberger and Scheer, 1995). En plus des composants nucléolaires, la gaine péri-chromosomique contient des protéines non nucléolaires comme des protéines de l'enveloppe nucléaire (Leung *et al.*, 2004; Rattner and Wang, 1992), ou la périchromonucléoline (Shi *et al.*, 1987). Cette gaine chromosomique pourrait permettre un transfert équitable de certains composants nucléaires entre les deux cellules filles et contribuer de manière plus efficace à la reformation du compartiment nucléaire, comme l'enveloppe ou les nucléoles (Hernandez-Verdun and Roussel, 2003).

Le désassemblage du nucléole s'opère selon un ordre précis. Des études quantitatives en imagerie ont révélé des cinétiques de dissociation particulières pour les facteurs

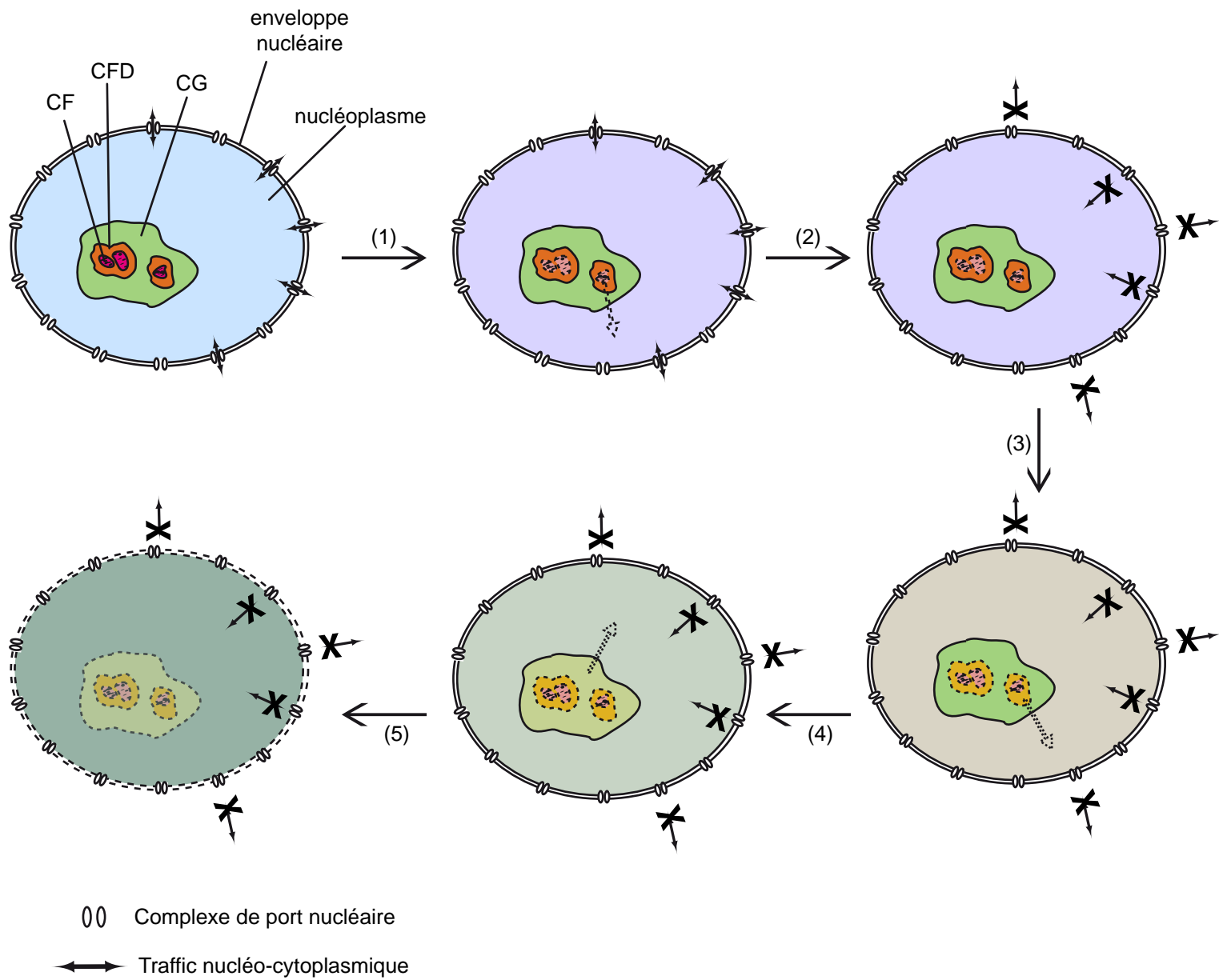


Figure 28 : Chronologie de désassemblage du nucléole et de ses compartiments en prophase.

- (1) : Dissociation de RPA39 et du FC
- (2) : Arrêt du trafic nucléocytoplasmique
- (3) : Dissociation de la fibrillarine, représentant le DFC
- (4) : Dissociation de B23 et du GC
- (5) : Déstructuration de l'enveloppe nucléaire

nucléolaires du FC, du DFC et du GC (Leung *et al.*, 2004). En effet, la sous-unité RPA39 de l'ARN polymérase I, localisée dans le FC, est la première protéine à se dissocier des nucléoles, suivie de la fibrillarine et de B23, respectivement présentes dans le DFC et le GC. La dissociation du FC, du DFC et du GC a lieu de façon séquentielle, entre le moment où l'enveloppe nucléaire perd son intégrité fonctionnelle (i.e. perte de sa fonction de barrière dans l'import et l'export) et le moment où l'enveloppe nucléaire se déstructure (Figure 28). Dans un 1^{er} temps, les protéines du FC diffusent. Cette étape est suivie dans un 2^{ème} temps par l'arrêt des échanges nucléocytoplasmiques. Dans un 3^{ème} temps, les protéines du DFC et du GC se dissocient et enfin l'enveloppe nucléaire se déstructure (Leung *et al.*, 2004).

Bien que les protéines impliquées dans la maturation des pré-ARNr co-localisent au niveau de la gaine chromosomique pendant la mitose, il n'est pas encore prouvé que les complexes de maturation soient conservés pendant la division cellulaire. Il a été montré que la maturation des particules pré-ribosomiques était réprimée à partir de la prométaphase jusqu'à l'anaphase, et que cette répression était indépendante de la mise en silence de la transcription des gènes ribosomiques (Dousset *et al.*, 2000; Sirri *et al.*, 2000).

La mise en place et le maintien de la répression de la maturation des ribosomes lors de la mitose demeure un processus non élucidé. Il est toutefois envisageable que des mécanismes comme la phosphorylation, l'acétylation ou la désacétylation des facteurs pré-ribosomiques par des complexes kinases/cyclines spécifiques de la mitose sont impliquées dans ce processus de répression. Le traitement à la roscovitine entraîne la reprise de la transcription des gènes ribosomes, mais le pré-ARNr 47S synthétisé n'est pas mûré (Sirri *et al.*, 2000). L'inhibition de CDK1/cycline B n'est donc pas suffisante pour réactiver le processus de maturation des pré-ARNr. Ces résultats montrent que si la levée de l'inhibition transcriptionnelle de l'ARN pol I en fin de mitose et la reprise de la maturation des pré-ARNr sont des événements concomitants, ces 2 processus sont régulés de manière différente. Il a été montré que la localisation de certaines protéines nucléolaires dépendait de l'activité

kinase du complexe CDK1/cycline B pendant la mitose. Toutefois, le comportement de ces protéines diffère selon le stade de la biogenèse des ribosomes auquel elles sont impliquées (Sirri *et al.*, 2002). En effet, suite à un traitement de cellules mitotiques avec la roscovitine, la fibrillarine, qui se concentrait au niveau de la gaine des chromosomes, se relocalise au niveau des NORs. Nop53, protéine impliquée plus tardivement dans la maturation des pré-ribosomes, présente également un changement de localisation suite au traitement par la roscovitine, passant d'une localisation péri-chromosomique à une concentration en de nombreux petits foci en périphérie des chromosomes. La localisation des facteurs pré-ribosomiques au niveau de la gaine chromosomique dépend de l'activité CDK1/cycline B, mais leur retour au lieu de synthèse des pré-ARNr nécessite d'autres acteurs et donc des mécanismes différents selon leur stade d'implication dans la maturation, puisque la fibrillarine et Nop53 n'adopte pas le même comportement au traitement à la roscovitine. Cependant, la mise en silence du processus de maturation des particules pré-ribosomiques ne dépend pas uniquement du maintien de cette localisation péri-chromosomique par CDK1/cycline B. En effet, le traitement par la roscovitine permet la levée de l'inhibition de la transcription des gènes ribosomiques et une relocalisation de facteurs pré-ribosomiques, mais la maturation des pré-ARNr néo-synthétisés ne reprend pas dans ces conditions (Sirri *et al.*, 2000; Sirri *et al.*, 2002). Bien que ni les acteurs ni les processus régulant la maturation des particules pré-ribosomiques pendant la mitose n'aient été décrits pour le moment, il semble cependant évident que des mécanismes indépendants de CDK1/cycline B sont impliqués dans la mise en silence de la maturation des pré-ARNr pendant la mitose.

II.2 – Reformation des nucléoles en sortie de mitose

La nucléologenèse post-mitotique se déroule au niveau des NORs, de la télophase jusqu'en G1. Les protéines nucléolaires impliquées dans la maturation des pré-ARNr sont en partie localisées en périphérie des chromosomes durant la métaphase. Elles peuvent

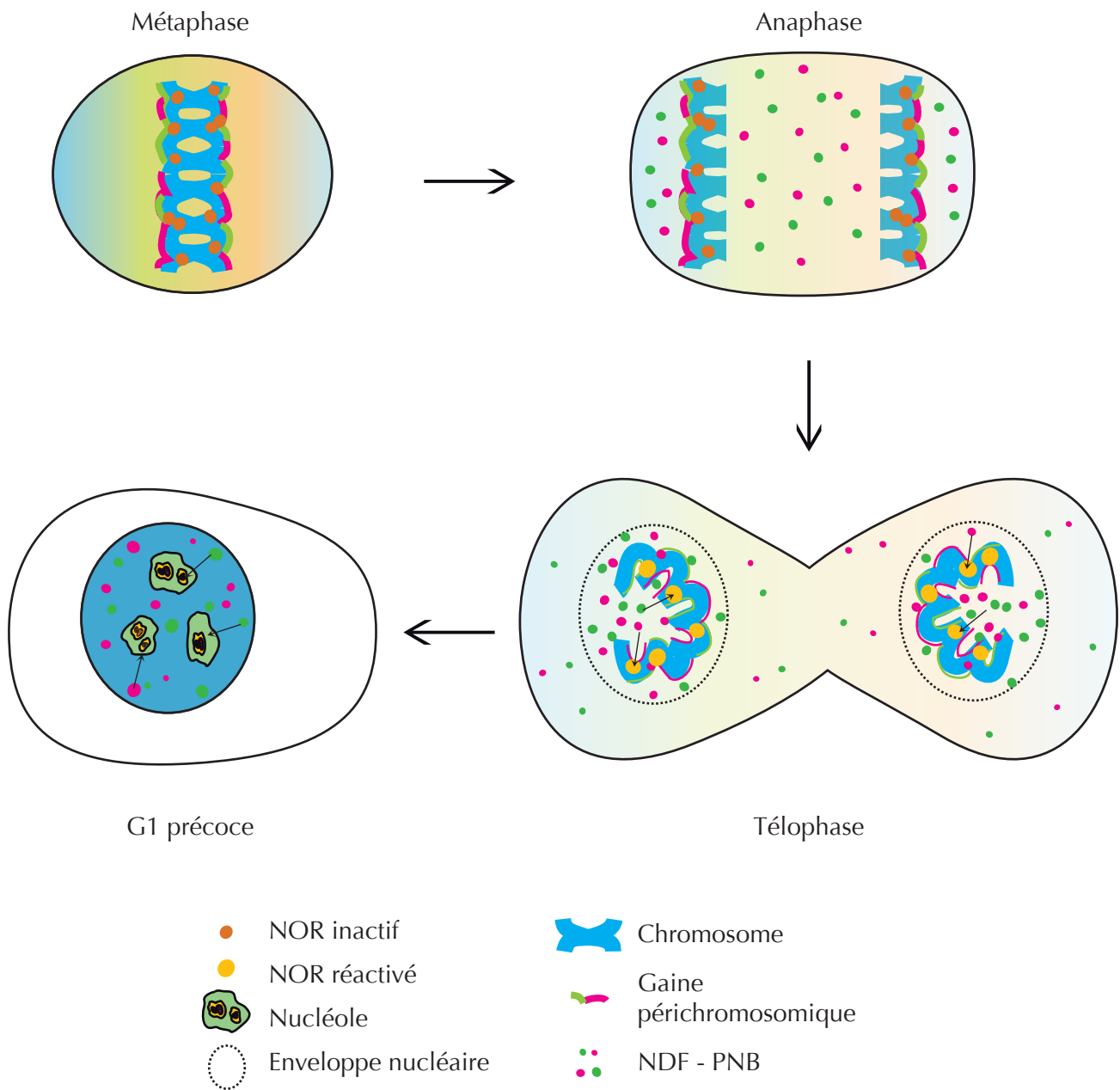


Figure 29 : Réassemblage des nucléoles en sortie de mitose.

En métaphase, les protéines nucléolaires se localisent au niveau de la gaine des chromosomes et sont également diffuses dans le cytosol. Lors de l'anaphase, une partie de ces protéines se concentrent en des points cytosoliques, les NDFs, mais la plus grande proportion de ces protéines garde leur localisation précédente (au niveau de la gaine chromosomique et diffuses dans la cellule). Au moment de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reconstruit, les NORs sont réactivés. Les protéines nucléolaires concentrées dans les PNBs dans le nucléoplasme sont progressivement recrutées au niveau des nucléoles néo-formés. En G1 précoce, les NDFs ne sont plus observables dans le cytoplasme des cellules. Les PNBs persistent quelques heures après la séparation des cellules filles puis disparaissent progressivement.

s'organiser sous forme de gaine péri-chromosomique (c'est le cas de la fibrillarine par exemple) ou rester au contact de certains chromosomes sous forme d'amas, également appelés « nucleolar remnants » (c'est par exemple le cas de la nucléoline). Ces protéines migrent avec chaque lot de chromosomes lors de l'anaphase, et sont réparties de manière à peu près équitable entre les deux cellules filles. Toutefois, une partie importante de ces facteurs occupent également l'espace cytosolique et ils vont également être partagés équitablement entre les deux cellules filles. Enfin, une partie beaucoup plus marginale de ces facteurs pré-ribosomiques s'agrège en fin de prométaphase dans des foci cytosoliques, appelés foci dérivés des nucléoles ou NDF (« Nucleolar Derived Foci »). En début de télophase, les protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes et qui entourent les chromosomes vont s'en dissocier pour former, avec les protéines nucléolaires dispersées dans le cytosol, une multitude de foci appelés corps pré-nucléolaires (ou PNB pour « Pre-Nucleolar Bodies »). Ces PNBs se localisent dans le noyau nouvellement formé des cellules filles (Figure 29). Les composants des PNBs vont alors progressivement retourner aux nucléoles nouvellement formés à partir des NORs, le réassemblage des nucléoles se faisant de façon concomitante à la réactivation de la transcription des gènes ribosomiques.

Le recrutement des protéines nucléolaires est cependant en partie indépendant de la reprise de la transcription. Lorsque la synthèse des ARNr est inhibée en fin de télophase par un traitement avec de l'Act D, les facteurs de la maturation ribosomique comme la fibrillarine ou B23 vont partiellement se rassembler au niveau des NORs bien que ces derniers soit ségrégués (Dousset *et al.*, 2000).

- Foci dérivés du nucléole

Les foci dérivés du nucléole apparaissent en prométaphase en dehors du fuseau mitotique. Le nombre de NDF diminue ensuite en fin de télophase, tandis que le nombre de PNB augmente et que le réassemblage des nucléoles débute. La composition protéique et

nucléique des NDF a été l'objet de peu d'études. Cependant, des protéines nucléolaires comme la fibrillarine, B23 ou Nopp140 (Ochs *et al.*, 1985; Thiry *et al.*, 2009) ainsi que le snoARN U8 et des pré-ARNs (Dundr and Olson, 1998; Dundr *et al.*, 2000) sont présentes dans ces structures. Par ailleurs, aucun composant de l'ARN pol I ou de ses co-facteurs n'y est détecté (Chan *et al.*, 1991; Scheer and Rose, 1984). Les NDF pourrait donc être des lieux de stockage ou d'assemblage des complexes de maturation des pré-ribosomes en attendant la reformation du noyau et des nucléoles et la reprise de la biogenèse ribosomique.

- Corps pré-nucléolaires ou PNB

Au moment de la reprise de la transcription par l'ARN pol I, les protéines nucléolaires se concentrent dans les corps pré-nucléolaires dans le nucléoplasme des 2 cellules filles. Les PNBs sont détectables jusqu'en début de la phase G1. Comme les NDFs, les PNBs sont composés d'acides nucléiques et de protéines nucléolaires. Les snoARN U3 et U14 ont été détectés dans ces corps nucléoplasmiques (Beven *et al.*, 1996; Jimenez-Garcia *et al.*, 1994), ainsi que des pré-ARNr (Dousset *et al.*, 2000; Dundr *et al.*, 2000). Les PNBs sont également composés des protéines du DFC et du GC impliquées dans la maturation ribosomique comme la fibrillarine, B23 et la nucléoline (Angelier *et al.*, 2005; Fomproix *et al.*, 1998; Ochs *et al.*, 1985). Toutefois, ils ne contiennent pas de protéines impliquées dans la transcription des gènes ribosomiques (Chan *et al.*, 1991; Roussel *et al.*, 1993).

Les PNBs semblent constitués de tous les précurseurs de l'ARNr 28S alors que seuls les précurseurs les plus précoces de la petite sous-unité y ont été mis en évidence (Dousset *et al.*, 2000; Dundr and Olson, 1998; Dundr *et al.*, 2000). Cependant, les études par FISH menées sur des cellules en mitose ont été réalisées avec des sondes ne révélant que les précurseurs les plus immatures de la biogenèse de la petite sous-unité. L'utilisation de sondes précoces s'hybridant à l'ETS1 ne permet pas de détecter la présence de précurseurs plus tardifs du 18S, comme les pré-ARNr 21S ou le 18S-E. Une sonde s'hybridant à l'ARNr

18S n'a cependant pas mis en évidence la présence de cet ARNr ni de ses précurseurs dans les PNBs alors qu'une sonde s'hybridant à l'ARNr 28S permet de détecter les PNBs jusqu'en phase G1 précoce (Dundr *et al.*, 2000). La présence dans les PNBs de précurseurs plus tardifs de l'ARN 18S n'est donc pas exclue. En effet, les études effectuées au laboratoire ont montré la présence de précurseurs tardifs de la maturation de la petite sous-unité au sein des PNBs. Je développerai ce point dans le chapitre Résultats-B-II.

Dans une même cellule, la composition protéique des différents PNBs n'est pas homogène. En effet, des expériences de localisation de protéines ont montré que la fibrillarine et la nucléoline n'étaient pas détectées dans les mêmes PNBs que Nop52, B23 ou PM/Scl100 (Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999; Savino *et al.*, 1999). Différents types de PNBs pourraient co-exister au sein d'une même cellule : des PNBs composés des protéines intervenant précocement dans la maturation des ribosomes, et d'autres PNBs constitués de facteurs pré-ribosomiques intervenant plus tardivement. Cependant, cette variation de la composition protéique des PNBs pourrait être tout simplement due à la séquentialité de recrutement des protéines nucléolaires au nucléole. En effet, les cellules observées sont en fin de télophase et début de G1, or la relocalisation aux nucléoles des protéines précoces, comme la fibrillarine, a déjà commencé. De fait, il semble probable voire normal que la composition protéique des PNBs au sein d'une même cellule varie en fonction de la dynamique de chacune de ces structures.

Les PNBs se résorbent donc graduellement au cours de la progression des cellules en phase G1. La disparition des PNBs semble être un processus passif de diffusion des protéines concentrées dans ces foci vers les nucléoles nouvellement formés (Savino *et al.*, 2001). Cependant, la résorption des PNBs se réalise selon un ordre précis de recrutement des protéines vers les nucléoles (Dundr *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2004; Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001). Les protéines impliquées le plus précocement dans la biogenèse des ribosomes sont les premières à être recrutées, tandis que les protéines nécessaires à des

stades plus tardifs de maturation demeurent plus longtemps dans les PNBs (Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a été montré que les protéines nucléolaires ne sont cependant pas confinées au sein d'un PNB, mais s'échangent entre les différents PNBs du noyau (Dundr *et al.*, 2000). Des expériences de FRAP (« Fluorescence Recovery After Photobleaching ») ont montré qu'après le photoblanchiment de la fibrillarine-GFP dans un PNB, le retour de fluorescence de la GFP avait lieu 20 sec après la perte de fluorescence. Environ 90% de la fibrillarine-GFP contenus dans les PNBs se désassocient et se réassocient rapidement de ces structures (Dundr *et al.*, 2000). Les protéines présentes dans les PNBs peuvent également former des complexes lors de certaines étapes de la mitose. Des expériences de FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») entre Nop52-GFP et B23-DsRed n'ont pas révélé de transfert d'énergie entre ces 2 protéines fluorescentes lorsqu'elles sont localisées en périphérie des chromosomes en métaphase et en début d'anaphase (Angelier *et al.*, 2005). Toutefois, une interaction entre ces 2 protéines est observée dès la formation des PNBs en télophase et début de G1. Le comportement de B23 et de Nop52 laisse penser que les PNBs seraient des plates-formes d'assemblage des complexes de maturation à ce stade du cycle cellulaire et que la séquentialité de recrutement des PNBs vers les nucléoles est un phénomène régulé.

La présence de pré-ARNr partiellement maturés avant la mitose pose l'hypothèse du rôle de ces pré-ARNr dans le contrôle ou la régulation de ce processus, comme centre de nucléation des PNBs par exemple. La séquentialité de recrutement des protéines nucléolaires aux PNBs serait donc expliquée par leur stade d'implication dans la maturation des pré-ARNr et la séquentialité de leur dissociation par la stabilité variable des pré-ARNr. Le recrutement de la machinerie de maturation des ARNr dépendrait donc de la formation des PNBs et des NDFs en début de télophase et en G1. Ces corps nucléoplasmiques et cytoplasmiques représenteraient des plateformes d'assemblage de pré-complexes de

maturation des ARNr grâce à la présence des pré-ARNr immatures de la cellule mère (Angelier *et al.*, 2005; Savino *et al.*, 2001).

En conclusion, la nucléogenèse requiert la réactivation de la transcription des gènes ribosomiques et de la machinerie de maturation des particules pré-ribosomiques ainsi que son recrutement aux nucléoles nouvellement formés. Ce processus est dépendant de l'activité des complexes CDK/cyclines spécifiques de la mitose et de la phase G1.

Le nucléole occupe une place centrale dans le domaine nucléaire des cellules eucaryotes, tant au niveau de la biogenèse des ribosomes que dans son implication dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. La description du processus de synthèse des ribosomes et ses liens avec la mitose pourrait ouvrir des voies d'étude du contrôle et de la régulation du cycle cellulaire.

Par ailleurs, les différentes étapes de dissociation et de reformation des nucléoles au cours de la division cellulaire présentent encore des zones d'ombres, notamment les mécanismes mis en jeu pour le contrôle de la maturation des particules pré-ribosomiques en mitose. D'autre part, les mécanismes intrinsèques de recrutement des protéines nucléolaires au sein des NDFs et des PNBs ainsi que leur libération ordonnée et progressive aux nucléoles en sortie de mitose restent des questions à explorer.

RÉSULTATS

A – L'analyse de deux facteurs pré-ribosomiques, bystine et hTsr1, souligne les différences dans l'évolution de la biogenèse des ribosomes entre levure et mammifères.

Les études sur la biogenèse des ribosomes menées chez les mammifères au cours des dernières années ont mis en évidence la conservation de ce processus entre *S. cerevisiae* et l'homme mais ont également révélé l'existence d'étapes spécifiques aux mammifères.

Dans notre équipe, il a été montré que, chez l'homme, les dernières étapes de maturation de la sous-unité 40S ont également lieu dans le cytoplasme, comme cela est le cas chez *S. cerevisiae* (Rouquette *et al.*, 2005). Cependant, chez l'homme, le dernier précurseur de l'ARNr 18S est le pré-ARNr 18S-E, produit à partir du clivage au site E de l'ITS1 au sein du pré-ARNr 21S. La description de ce précurseur a donc mis en évidence une étape supplémentaire de maturation des pré-ARNr dans la voie menant à l'ARN 18S mature. Une étude approfondie de ce processus chez les mammifères s'est alors révélé nécessaire afin de décrire plus précisément les étapes spécifiques aux métazoaires.

C'est dans cette perspective que s'est inscrit mon travail de thèse. Je me suis plus particulièrement attachée à l'étude de la fonction de 2 protéines humaines, orthologues des facteurs pré-ribosomiques de levure Enp1p et Tsr1p. Au cours de ma thèse, des études ont été menées sur la fonction de la bystine/Enp1 au sein des cellules de mammifères (pour revue, (Fukuda *et al.*, 2008)). En effet, cette protéine a d'abord été décrite pour son implication dans l'adhérence cellulaire, notamment dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus (Stewart and Nordquist, 2005; Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). De par son homologie avec le facteur pré-ribosomique Enp1p de levure, son rôle dans la biogenèse des ribosomes chez l'homme a été décrit par Miyoshi *et al.* au cours de ma thèse (Miyoshi *et al.*, 2007).

Dans cette partie du travail, l'étude de la conservation de fonction de bystin/Enp1 et de Tsr1 dans les cellules humaines a été réalisée par perte d'expression par un traitement

avec des siARN spécifiques des ARNm codant ces 2 protéines. Les effets de l'absence de l'une ou l'autre des protéines sur la biogenèse des ribosomes ont été étudiés par différentes techniques, comme par exemple l'examen des pré-ARNr par Northern blot ou l'analyse de la production des sous-unités matures par séparation sur gradient de saccharose. Ainsi, nous avons montré la conservation fonctionnelle de ces 2 facteurs dans le processus de maturation de la sous-unité 40S. Cependant, l'étude de ces 2 facteurs a également soulevé des différences de mécanismes au cours de ce processus entre levure et homme.

La bystine est requise pour un clivage efficace au site 2 au sein de l'ITS1 et pour la maturation du pré-ARNr 21S en pré-ARNr 18S-E. En effet, en absence de bystine, nous avons observé l'accumulation de pré-ARNr 41S et 21S, ainsi que l'accumulation d'un nouvel intermédiaire, le pré-ARNr 21S-C (C pour Court). Cette observation nous a permis de mettre également en évidence la présence de cet intermédiaire dans des cellules contrôles. L'analyse de l'extrémité 3' par Northern blot grâce à l'utilisation de sondes s'hybridant à différents niveaux de l'ITS1 et par 3'-RACE ont permis de déterminer l'extrémité 3' du pré-ARNr 21S-C entre les nucléotides 635 et 650 de l'ITS1. La traînée observée en Northern blot au niveau du 21S-C ainsi que l'hétérogénéité des extrémités obtenues en 3'-RACE laisse penser que le pré-ARNr 21S est mûri en cet intermédiaire par une exonucléase 3'-5'. Une autre hypothèse serait que le pré-ARNr 21S-C corresponde à une espèce d'ARNr présent suite à une pause de cette exonucléase. Par ailleurs, l'absence de bystine entraîne la disparition du pré-ARNr 36S, obtenu par clivage direct au site E à partir du pré-ARNr 41S. La bystine est donc requise pour un clivage efficace des précurseurs précoces au site 2 dans l'ITS1 et pour la maturation des pré-ARNr 21S et 21S-C en pré-ARNr 18S-E. Le rôle de la bystin dans la maturation de l'ITS1 chez l'homme est donc comparable à celui de Enp1p chez la levure *S. cerevisiae*.

Quant à Tsr1, nous avons montré que ce facteur pré-ribosomique est requis pour l'export nucléocytoplasmique des particules pré-40S dans les cellules humaines. La perte

d'expression de hTsr1 n'entraîne pas de défaut majeur de maturation des pré-ARNr, quand ceux-ci sont analysés par Northern blot. Cependant, lors de l'étude de la localisation des particules pré-ribosomiques par FISH avec une sonde 5'ITS1, nous avons observé une accumulation nucléoplasmique des pré-ribosomes dans les cellules n'exprimant pas hTsr1. Cette accumulation correspond à un défaut d'export des particules pré-40S. Ce phénotype est comparable à celui observé en absence de RPS15 (Rouquette *et al.*, 2005). Ce défaut d'export de la petite sous-unité immature observé par FISH est confirmé par l'étude de la distribution nucléocytoplasmique du pré-ARNr 18S-E. En effet, après fractionnement subcellulaire et analyse par Northern blot, la fraction nucléaire est enrichie en pré-ARNr 18S-E en absence de hTsr1. Ce facteur pré-ribosomique est donc nécessaire pour un trafic normal des particules pré-40S du noyau vers le cytoplasme. Tout comme son orthologue de levure, hTsr1 est donc requise pour les étapes tardives de maturation des particules pré-40S.

Cette étude montre donc que ces 2 facteurs pré-ribosomiques spécifiques de la petite sous-unité sont les orthologues fonctionnels des protéines de levure. Ces données mettent également en exergue le fait que la maturation et l'export nucléaire de cette sous-unité ne sont pas régis par les mêmes règles chez l'homme et chez la levure. Cette variation dans le tempo export/maturation pourrait être due aux étapes supplémentaires de maturation de l'ITS1 chez l'homme, ce qui pourrait modifier la compétence des particules pré-40S pour l'export nucléocytoplasmique.

I – Publication

Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals

Coralie Carron^{1,2}, Marie-Françoise O'Donohue^{1,2}, Valérie Choesmel^{1,2},
Marlène Faubladièr^{1,2} and Pierre-Emmanuel Gleizes^{1,2,*}

¹Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote and ²CNRS, LBME, F-31000 Toulouse, France

Received July 2, 2010; Revised August 3, 2010; Accepted August 4, 2010

ABSTRACT

Recent studies reveal that maturation of the 40S ribosomal subunit precursors in mammals includes an additional step during processing of the internal transcribed spacer 1 (ITS1), when compared with yeast *Saccharomyces cerevisiae*, even though the protein content of the pre-40S particle appears to be the same. Here, we examine by depletion with siRNA treatment the function of human orthologs of two essential yeast pre-ribosomal factors, hEnp1/bystin and hTsr1. Like their yeast orthologs, bystin is required for efficient cleavage of the ITS1 and further processing of this domain within the pre-40S particles, whereas hTsr1 is necessary for the final maturation steps. However, bystin depletion leads to accumulation of an unusual 18S rRNA precursor, revealing a new step in ITS1 processing that potentially involves an exonuclease. In addition, pre-40S particles lacking hTsr1 are partially retained in the nucleus, whereas depletion of Tsr1p in yeast results in strong cytoplasmic accumulation of pre-40S particles. These data indicate that ITS1 processing in human cells may be more complex than currently envisioned and that coordination between maturation and nuclear export of pre-40S particles has evolved differently in yeast and mammalian cells.

INTRODUCTION

During the past 10 years, proteomic and genetic studies have allowed the identification of approximately 190 proteins that play a role in eukaryotic ribosome biogenesis, from the initial nucleolar steps to final processing in the cytoplasm (1–6). These proteins, called pre-ribosomal

factors, display different functions including endo- or exoribonucleases, RNA helicases, chaperones, NTPases or methyl transferases (2,5). They are implicated in ribosome biogenesis but do not form part of mature ribosomes.

Early ribosomal proteins and pre-ribosomal factors assemble co-transcriptionally in the nucleolus with the neo-synthesized pre-ribosomal RNA (pre-rRNA), forming the so-called 90S pre-ribosomal particle (3,7). The large polycistronic rRNA precursor contains the future 18S, 5.8S and 28S mature ribosomal RNAs flanked by external and internal transcribed spacers (ETSs and ITSs), which are progressively removed through endonucleolytic cleavages and exonucleolytic processing (Figure 1A) (8,9). Early processing steps include enzymatic modifications of nucleotides, by 2'-O-ribose methylation or pseudo-uridylation (10,11), together with removal of the 5'- and 3'-ETS and endonucleolytic cleavage of the ITS1 (Figure 1B and C). This latter step splits the 90S particle into pre-40S and pre-60S particles, which then follow two separate processing pathways that involve distinct pre-ribosomal factors (4,12). Both particles are exported from the nucleus and their maturation is completed in the cytoplasm (13–16). Association and dissociation of these numerous pre-ribosomal factors along the maturation pathway renders the composition of pre-ribosomal particles highly dynamic. The exact activity or function of most of the pre-ribosomal factors remains unclear, even when the step at which they are implicated is known.

The list of pre-ribosomal factors composing the pre-40S particles is much shorter than that for the large subunit (3,17–19). Following cleavage of the ITS1, the majority of the factors present in the 90S particle dissociate, although a few remain part of the pre-40S particle, including Enp1p, Dim1p, Rrp12p and Bms1p (3,17). Dim1p, a methyltransferase associated with both the 90S and the pre-40S particles, methylates two adjacent nucleotides in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 561 335 927; Fax: +33 561 335 886; Email: gleizes@ibcg.biotoul.fr

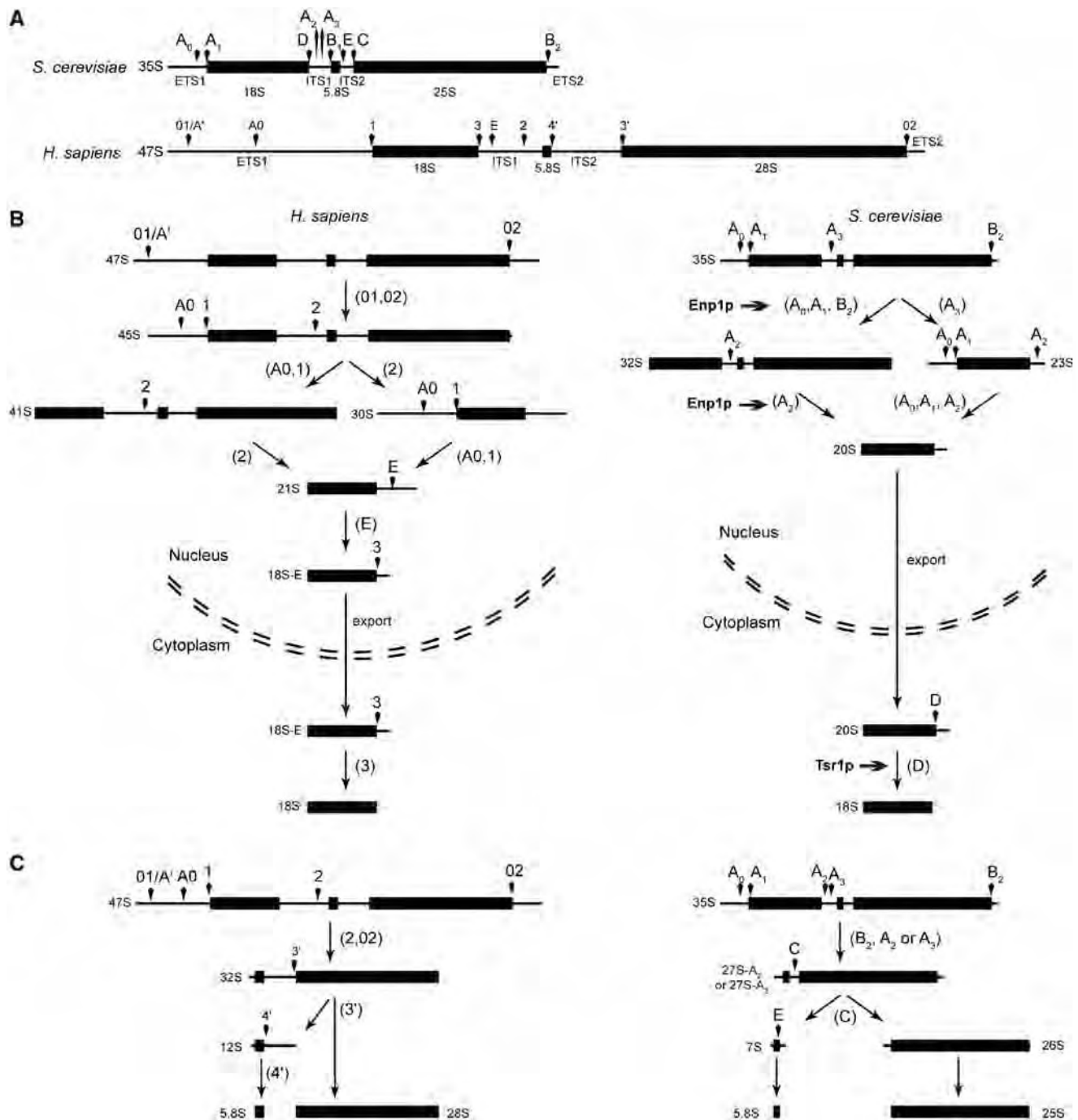


Figure 1. Pre-rRNA processing in HeLa cells. (A) Comparison between the yeast and human large polycistronic rRNA precursor. These two pre-rRNAs have been scale-drawn. (B) 18S rRNA-processing pathways in Human (left panel) and yeast (right panel). Two pathways are presented, according to the kinetics of the ETS1/5'-ETS or ITS1 maturation. The steps at which Enp1p and Tsr1p are involved are indicated. (C) Processing pathways for the large ribosomal subunit RNAs in human (left panel) and yeast (right panel).

the 3'-end of the 18S rRNA (20). Enp1p and Bms1p are known to be implicated in the processing of ETS1 and ITS1 (21–23), but their molecular functions remain unclear. Rrp12p, a HEAT repeat containing protein, is able to interact with nuclear pore complex components and appears to be required for the nuclear export of the pre-40S particle (24). These proteins are joined by other pre-ribosomal factors that assemble specifically with the

pre-40S particle. Hence, Ltv1p in yeast, as well as the kinase hRio2 in human, were proposed as adapters for exportin Crm1p which is required for transport to the cytoplasm (25,26). Hrr25p, a protein kinase, regulates association of the ribosomal protein Rps3p to the pre-40S particle, allowing a structural modification of the pre-40S particle beak, which could be required for passage through the nuclear pore complex (27). The Rio kinases and Tsr1p

are also required for the final cytoplasmic steps, but their molecular function remains to be elucidated (22,28,29). Finally, Nob1p is the endoribonuclease responsible for the cleavage at site D, which matures the 20S pre-rRNA into the 18S rRNA in the cytoplasm (30–33).

Assembly of the pre-ribosomal factors into pre-ribosomes is presumably highly coordinated with pre-rRNA processing and intracellular transport of the particles. Recently, the pre-40S particle composition was characterized in human cells (26). It appears that the pre-ribosomal factors assembled in the pre-40S particle are highly conserved between *Saccharomyces cerevisiae* and human cells. However, ITS1 processing in yeast and mammals is clearly different. After ITS1 cleavage at site A₂ in yeast, elimination of the ITS1 within the pre-40S particles requires a single cytoplasmic cleavage step at the 3'-end of the 18S rRNA (Figure 1B) (13). In contrast, one detects two abundant intermediates in pre-40S particles in mammalian cells, namely the 21S and 18S-E pre-rRNAs. These RNAs correspond to two processing steps, the 21S pre-rRNA being cleaved in the nucleus and the 18S-E species in the cytoplasm (15) (Figure 1B). Therefore, even if the protein content of pre-40S particles is conserved, the pre-ribosomal factors must have evolved to accommodate an increase in complexity of pre-rRNA maturation from yeast to mammals.

To further investigate similarities and differences between yeast and human 40S ribosomal subunit biogenesis, we have studied the role of the human orthologs of two pre-ribosomal factors implicated at two distinct steps of pre-40S particle processing in yeast: Enp1p and Tsr1p. These factors are both essential in yeast. In addition, they are involved at different steps of pre-40S maturation: Enp1p is required for efficient cleavage of the ITS1 in the nucleus (7), whereas Tsr1p is necessary for cleavage at the 3'-end of the 18S rRNA in the cytoplasm (22,28,29). hTsr1, the human ortholog of Tsr1p, was recently found in human pre-40S particles, but its specific role in 40S subunit production is still unclear (26). Bystin/Enp1, the human ortholog of Enp1p, was first identified as a component of a cytoplasmic complex-mediating adhesion of human trophoblast and endometrial epithelial cells *in vitro* (34,35), as well as an essential protein for early embryonic development after implantation of the embryo in mouse and rat (36–38). Recently, it was reported that human bystin is overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and is essential for cell growth and tumor development (39). The involvement of bystin in ribosome biogenesis has also been described (38,40). Further analysis of the functions of bystin and hTsr1 in human ribosome biogenesis indicates that these two proteins are indeed functional orthologs of their yeast counterparts, but highlights differences in pre-40S particle biogenesis between yeast and human.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

To construct pEGFP-bystin and pEGFP-hTsr1, bystin and hTsr1 cDNAs were generated by RT-PCR and

cloned into the HindIII and XbaI sites of pEGFP-C3 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA), in-frame with the sequence encoding EGFP. EGFP alone was expressed from pEGFP-C3. Transfection of HeLa cells was performed by electro-transformation with 10 µg of plasmidic DNA, as described below for siRNAs.

Cell culture and inhibitor treatments

Human cervical carcinoma HeLa cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing Glutamax[®] as a supply of L-glutamine, and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK). Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂. RNA polymerase I transcription was selectively inhibited by 50 ng/ml actinomycin D for 2 h.

Knockdown of gene expression with small interfering RNAs

Two or three 21-mer siRNA duplexes were designed and purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) to knockdown expression of human genes encoding bystin (GenBank accession number: NM_004053) and hTsr1 (GenBank accession number: NM_018128), which are two ribosomal factors associated with the small 40S subunit. After washing the cells once in DMEM (without serum and antibiotics), 10 µl of 100 µM siRNA solution were added on ice to 10⁷ HeLa cells in suspension in 200 µl of the same medium. Electro-transformation was performed at 250 V and at 950 µF with a Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), in a cuvette with a 4-mm inter-electrode distance. The cell suspension was then plated on a 200-cm² Petri dish containing 20 ml DMEM supplemented with calf serum and antibiotics. Control samples were electro-transformed with a scramble siRNA (siRNA-negative control duplex; Eurogentec). The efficiency of the downregulation induced by each siRNA was assessed by quantitative reverse transcriptase-PCR, taking GAPDH as an internal control to normalize expression of the target genes. As the most efficient knockdowns were obtained with a mixture of siRNAs *bystin-1* (5'-cugcccaaggcauuu aagadtdt-3') and *bystin-2* (5'-gagguugagacagucaugud tdt-3'), and with siRNA *tsr1-1* (5'-cuggaacaguacacuugaa dtdt-3'), these conditions were used for the experiments herein described. The siRNA targeting hRPS15 (siRNA *rps15-2*: 5'-UCACCUACAAGCCCGUAAA-3') has been described previously (15).

Cell fractionation and RNA extractions

After treatment with siRNAs for 48 h, the cells were successively washed at 4°C with DMEM, PBS and Buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl). One-tenth of the suspension was kept for total RNA extraction. The cells were then mechanically disrupted with a Dounce homogenizer in Buffer A containing 0.5 mM DTT. After centrifugation at 4°C and at 1000g for 10 min, the supernatant (i.e. cytoplasmic fraction) was frozen. The pellet containing the nuclei was washed with

10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3.3 mM MgCl₂ and 250 mM sucrose. After centrifugation, the nuclei were suspended in a solution containing 10 mM MgCl₂ and 250 mM sucrose, and further purified by centrifugation for 10 min at 500g on a sucrose cushion (0.5 mM MgCl₂, 350 mM sucrose). The pellet was then lysed in 10 volumes of 50 mM Na acetate, pH 5.1, 140 mM NaCl, 0.3% SDS and the nuclear RNAs were extracted twice with phenol. Total and cytoplasmic RNAs were purified with Trizol reagent. After alcohol precipitation, RNA pellets were dissolved in H₂O, quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and diluted to 1 mg/ml.

Analysis of ribosomes by sucrose density gradient centrifugation

Forty-eight hours after transfection, HeLa cells were treated with 100 µg/ml cycloheximide (Sigma) for 10 min. The cytoplasmic fractions were prepared on ice as described above, except that cycloheximide was added to all buffers. On each 10–50% (w/w) sucrose gradient, 1 mg proteins was loaded, prepared with a Gradient Master former (BioComp Instruments, Frederickton, NB, Canada). The tubes were centrifuged at 4°C and at 36000 r.p.m. for 105 min in a SW41 rotor (Optima L100XP ultracentrifuge; Beckman Coulter, Villepinte, France). The gradient fractions were collected at OD_{254 nm} with a Foxy Jr. gradient collector (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA).

Analysis of pre-rRNA species

Pre-rRNA species were analyzed by northern blot. RNAs (3 µg/well for total and nuclear extracts, 6 µg/well for cytoplasmic extracts), mixed with 3 volumes of loading dye (25 mM MOPS, 6% formaldehyde, 1.5% formamide, 0.16 µg/ml BET) were separated on a 1% agarose gel in the presence of MOPS buffer (20 mM MOPS, 6 mM sodium acetate, 7 × 10⁻² N NaOH, 0.5 M EDTA pH 8.0) containing 6% formaldehyde, and run in MOPS/formaldehyde buffer (1 × MOPS, 6% formaldehyde) at 140 V. RNAs were then transferred to a Hybond N⁺ nylon membrane (GE Healthcare, Orsay, France). After fixation by UV-crosslinking, the membranes were pre-hybridized for 1 h at 45°C in 6 × SSC, 5 × Denhardt's solution, 0.5% SDS, 0.9 µg/ml tRNA. The ³²P-labeled oligodeoxynucleotide probe was then added and incubated overnight at 45°C. The probes used in the present study were 18S (5'-ttacttctctagatagcaagttcgacc-3'), 5'ITS1 (5'-ctcgcctc cgggctcggtaaatgac-3'), ITS1-160 (5'-tctcctcccagttctc gg-3'), ITS1-605 (5'-ttaaactcgcgcgggaac-3'), ITS1-639 (5'-gaccacggggcggcggcgatc-3'), ITS1-721 (5'-ggagcggagt ccgcggtg-3'), ITS1-779 (5'-gtaaagccccaccgcgac-3'), ITS2b (5'-ctcgcgagggaacccccagccgcgca-3'), ITS2d/e (5'-gcg cgacggcgacgacaccgcggtc-3') and 28S (5'-cccgttcctt ggctgtgttctgctagata-3'). For detection of ITS2, probes ITS2b and ITS2d/e were mixed in equal amounts. After hybridization, the membranes were washed twice for 10 min at room temperature in 2 × SSC, SDS 0.1% and once in 1 × SSC, SDS 0.1%. Labeled RNA signals were acquired with a FLA2000 PhosphorImager

(Fuji, Stamford, CT, USA) and quantified with ImageGauge software. The 3'RACE analysis was adapted from Kiss and Filipowicz (41). The forward primer used for PCR amplification spanned nucleotides 582–599 in the ITS1: the ITS1-583 primer (5'-ccgcccaggtaccta-3'). The amplified fragments were subcloned and automatically sequenced.

Detection of fluorescent proteins and fluorescence *in situ* hybridization microscopy

For fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments, cells grown on glass cover slips were washed twice in PBS and then fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde in PBS (EMS, Hartfield, PA, USA). After being rinsed in PBS, cells were permeabilized for 18 h in 70% ethanol at 4°C. After two washes in 2 × SSC containing 10% formamide, hybridization was performed in the dark at 37°C for 5 h in a buffer containing 10% formamide, 2 × SSC, 0.5 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfate, 250 µg/ml BSA, 10 mM ribonucleoside vanadyl complexes and 0.5 ng/µl of each probe. Precursors to the 18S rRNA were localized with the 5'-ITS1 probe conjugated to Cy3 or Cy5 (GE Healthcare) on amino-modified deoxythymidine (a probe complementary to the 3'-end of the 18S rRNA and the 5'-end of the ITS1), with the ETS1-b probe (5'-agacgacaacgcctgacacgcacggcac-3') conjugated to Cy5 (localized between the 5'-end of the ETS1 and the 01/A' cleavage site), with the ETS1-1399 probe (5'-cgctagagaaggctttctc-3') conjugated to Cy5 (which hybridizes to the 47S pre-rRNA between 01/A' and A0 cleavage sites) or with the 5.8S-ITS2 probe (5'-gcgattgatcggaagcgcgctc-3') conjugated to Cy3 (a probe complementary to the 3'-end of the 5.8S rRNA and the 5'-end of the ITS2). After two washes at 37°C with 2 × SSC containing 10% formamide, the cover slips were rinsed in PBS and DNA was counterstained with 1 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes). After 10 min incubation at room temperature, the cover slips were rinsed twice in PBS and mounted in Mowiol 4.88 (Polyscience Inc., Eppelheim, Germany).

For detection of fluorescent proteins after transient transfection, cells grown on glass cover slips were washed twice in PBS and then fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde in PBS (EMS). After being washed twice in PBS, DNA was counterstained with Hoechst 33342 for 10 min at room temperature. The cover slips were then rinsed twice in PBS and mounted in Mowiol 4.88.

Observations were made with an inverted IX-81 microscope (Olympus, Rungis, France), equipped with a motorized stage (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf, Germany) and a Coolsnap HQ camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA), driven by MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). Cells were observed using a planapochromat ×100, 1.4 numerical aperture oil immersion objective, mounted on a PIFOC[®] piezo stepper (PI, Karlsruhe, Germany). The light source was a Polychrome V monochromator (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) equipped with a 150 W Xenon source and used with a 15-nm bandwidth. For

multi-labeling experiments, multiband dichroic mirrors (Chroma, Rockingham, VT, USA) were used to avoid pixel shift in the acquisition plane. Specific single-band emission filters were mounted on a motorized wheel (PI). Images were captured with the same exposure times for different samples. The gray levels were scaled within the same limits in order to allow sample comparison. Fluorescence quantification of regions of interest was performed on 12-bit images using MetaMorph software. After background subtraction, the results were expressed as an amount of gray levels/pixel. Fluorescence was quantified in four identical regions of interest in the nucleoplasm and the cytoplasm in at least 24 cells per sample.

RESULTS

Human orthologs of Enp1p and Tsr1p

Bystin presents 55% similarity and 36% identity with yeast Enp1p, whereas hTsr1 and Tsr1p share 51% similarity and 30% identity. Similarity between bystin and Enp1p reaches 75% (50% identity) in the C-terminal core domain which defines the specific 'bystin domain', whereas their N-termini are more divergent. The bystin domain of Enp1p has a truncated 5' extremity (Figure 2A). Two highly conserved domains are found in hTsr1 and Tsr1p: the DUF663 domain, whose function is unknown but which is also found in Bms1; and the AARP2CN domain, which is weakly similar to the GTP-binding domain of elongation factor TU.

When expressed as GFP fusions, both proteins were mainly located in the nucleus and concentrated in the nucleolus, while the cytoplasm was faintly stained (Figure 2B). For bystin, this staining pattern was similar to immunodetection of the endogenous protein (data not shown) and confirmed data from previous reports (26,38,40). After arrest of RNA polymerase I transcription

and segregation of the nucleolar components by actinomycin D treatment (42), both GFP-bystin and GFP-hTsr1 were detected in the crescent-shape granular component, consistent with their putative association with pre-ribosomal particles in the nucleolus (Figure 2B).

Bystin and hTsr1 are necessary for 40S ribosomal subunit formation

Requirement of bystin or hTsr1 for ribosome synthesis was assessed by knocking-down expression of these proteins with siRNAs. In both cases, mRNA levels were reduced by 84–90% (data not shown). Ribosome production after bystin- or hTsr1 depletion was analyzed from cytoplasmic fractions prepared in the presence of cycloheximide and separated on sucrose density gradients (Figure 3A). Control cells electro-transformed with a scrambled siRNA displayed a typical profile with peaks corresponding to the 40S and 60S subunits, 80S ribosomal particles and polysomes of increasing lengths. After knocking-down bystin, the levels of free 40S subunits and 80S particles were severely decreased, while 60S subunits accumulated. A similar phenotype was also observed upon depletion of hTsr1, although the decrease in 40S subunits was less pronounced. This imbalance in the levels of 40S and 60S subunits indicates a deficit of 40S production. Consistently, the 18S/28S rRNA ratio was ~30% lower in bystin- or hTsr1-deficient cells than in control cells (see histogram in Figure 3C).

Bystin depletion uncovers an additional step in ITS1 processing

In order to determine the pre-rRNA processing steps of the 40S particle maturation pathway involving bystin and hTsr1, pre-rRNAs were analyzed by northern blot with probes hybridizing to the ITS1 or the ITS2 (Figures 3 and 4). In parallel, the intracellular fate of the pre-ribosomes was monitored by FISH with probes

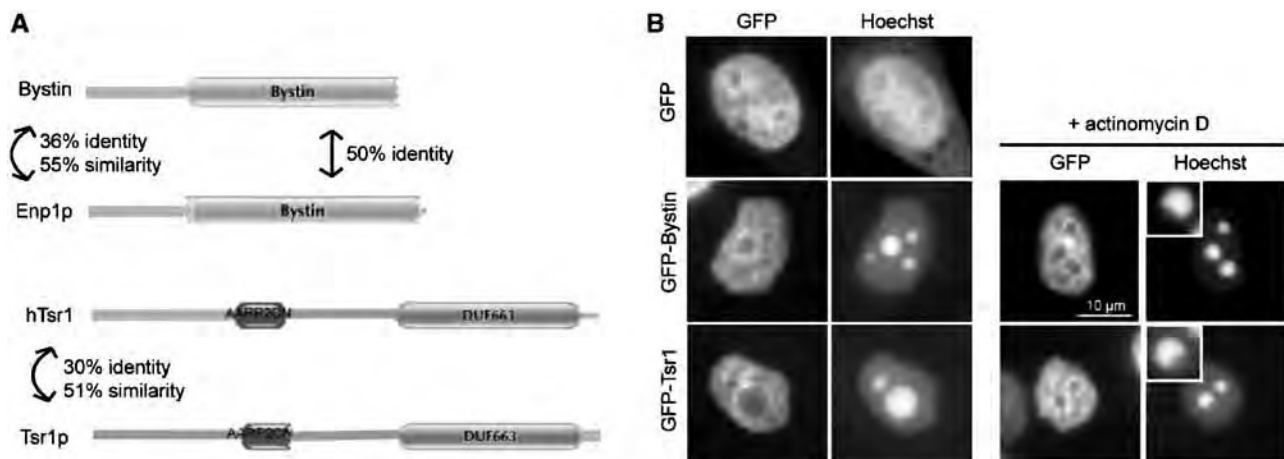


Figure 2. Structural domains and intracellular localization of bystin and hTsr1. (A) A search for specific protein domains was performed with InterproScan. Bystin and Enp1p present a 'bystin domain', characteristic of the bystin protein family. hTsr1 and Tsr1p have an AARP2CN domain, similar to the GTP-binding domain of the elongation factor TU, and a DUF663 domain of unknown function which is also found in Bms1. (B) Cells transfected with plasmids pGFP, pGFP-bystin or pGFP-hTsr1 were observed after chemical fixation and nucleus counterstaining with Hoechst 33342. Treatment with 50 ng/ml actinomycin D for 3 h provokes nucleolar segregation. Boxes show individual nucleoli with a labeled crescent, the characteristic shape of the granular component in segregated nucleoli. Bar = 10 μ m.

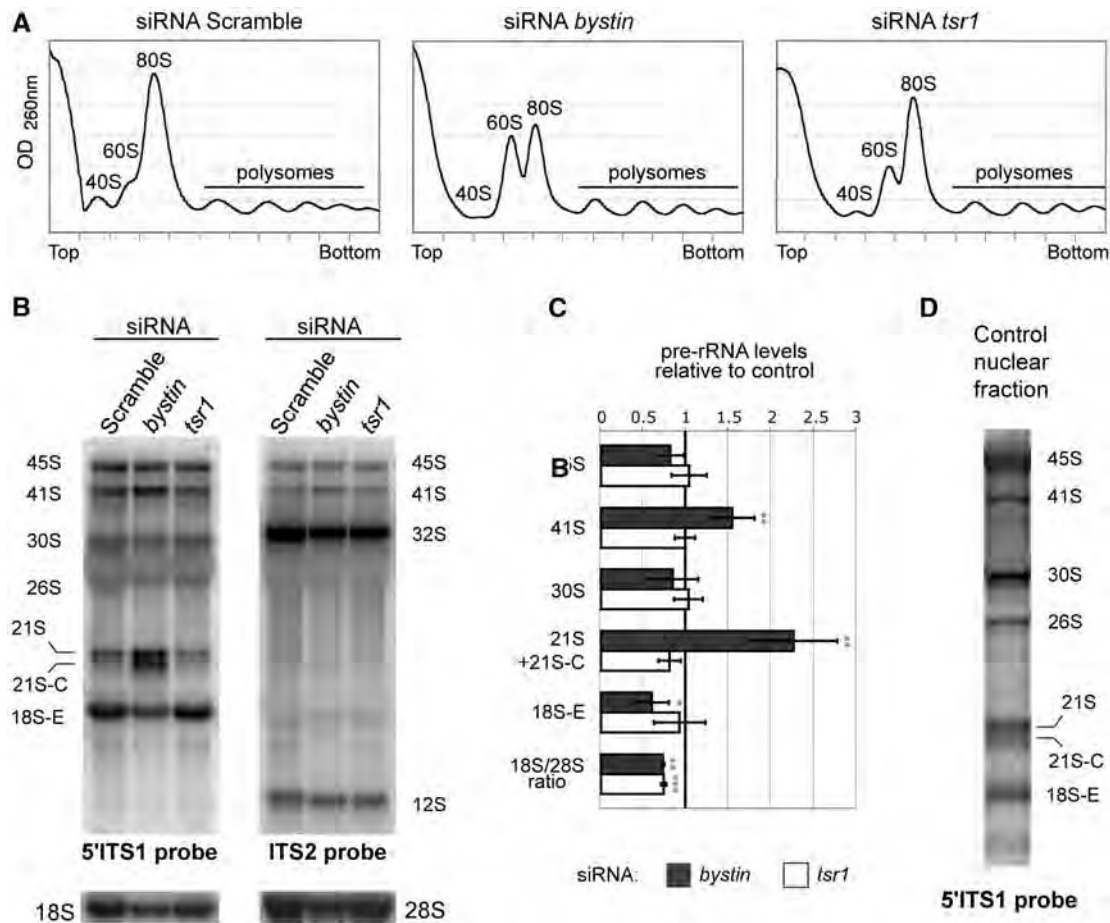


Figure 3. Impact of bystin or hTsr1 depletion on ribosome biogenesis. **(A)** Cytoplasmic fractions, prepared from cycloheximide-treated cells transfected for 48 h either with a scramble siRNA or a siRNA targeting bystin or hTsr1, were separated on sucrose gradients by ultracentrifugation. **(B)** Identical amounts of RNAs (3 μ g) from HeLa cells, extracted 48 h after transfection, were separated on a 1% agarose gel and then transferred to a nylon membrane. The pre-rRNA species were revealed by hybridization with various 32 P-labeled probes (5'ITS1, an equimolar mixture of ITS2b and ITS2d/e, or a mixture of 18S and 28S probes). Pre-rRNAs are described in Figure 1, except the 26S species which extends from site A0 to 2. **(C)** The labeling of each band was quantified with a phosphorimager and normalized to the amount of 28S RNA measured in the corresponding lane. The means of six different samples in three independent northern blots are presented in the histogram as variation rates relative to control cells. Pair-wise statistical analysis was performed with Student's *t*-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **(D)** Northern blot analysis with the 5'ITS1 probe shows presence of the 21S-C species in nuclear RNAs from control HeLa cells.

complementary to the 5'-ETS/ETS1, the ITS1 or the ITS2 (Figure 5).

Cells treated with bystin-specific siRNAs over-accumulated 41S and 21S pre-rRNAs, while the amount of 18S-E pre-RNA decreased (Figure 3B and 3C). The build-up of 41S pre-rRNA was also evidenced with the ITS2 probes, while the 32S and 12S large subunit precursors were unaffected compared with control cells. These pre-rRNA patterns indicate delayed cleavage in ITS1 at site 2 and deficient maturation of the 21S pre-rRNA within the pre-40S particles.

In addition, we observed the conspicuous build-up of a shorter form of the 21S pre-rRNA, that we named 21S-C (*court* is the French for short). Such a form was previously described upon depletion of RPS19, and named 20S pre-rRNA (43); however this nomenclature is confusing considering the 20S pre-rRNA in *S. cerevisiae*. Careful examination of total RNAs' northern blot profiles showed the reproducible presence of a shoulder in the

21S peak at this position in control cells, suggesting that the 21S-C is a regular processing intermediate that accumulates upon bystin depletion (data not shown). Indeed, this intermediate could be clearly detected in the nuclear fraction of control cells (Figure 3D).

Additional probes were used to determine the 3'-end of this species by northern blot (Figure 4A). Both the 21S and 21S-C pre-rRNAs were revealed with probes spanning position 170 (ITS1-160) and 615 (ITS1-605) in the ITS1. In contrast, probes hybridizing around nucleotides 650 (ITS1-639) or 730 (ITS1-721) no longer revealed the 21S-C RNA. Considering that at least 15 nt are required for specific hybridization of these oligonucleotidic probes in our experimental conditions, these results indicate that the 3' extremity of the 21S-C pre-rRNA is roughly located between nucleotides 620 and 655 of the ITS1 (Figure 4B). If the 21S-C pre-rRNA resulted from an alternative endonucleolytic cleavage in the ITS1, one would expect the appearance of a complementary cleavage product.

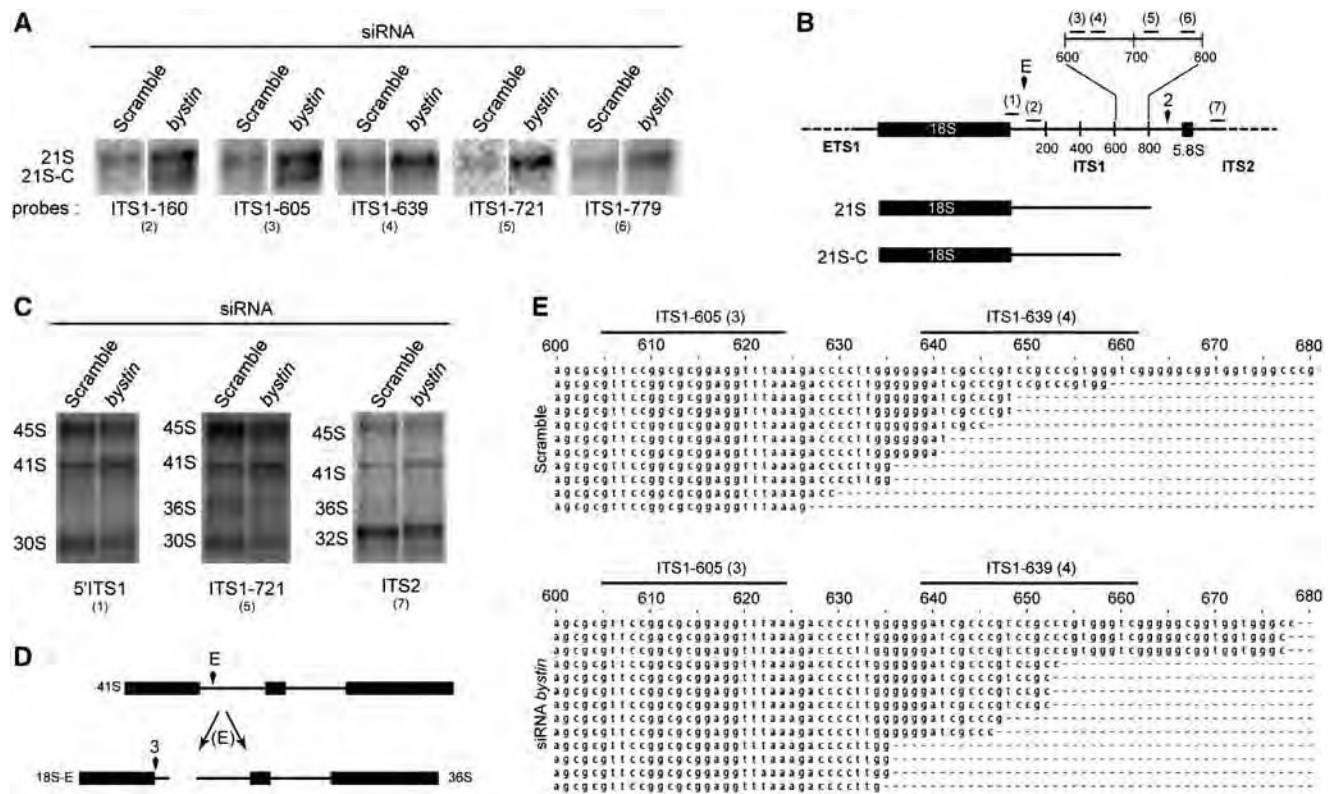


Figure 4. 3' extremity of the 21S-C pre-rRNA. (A) Five specific probes (ITS1-160, ITS1-605, ITS1-640, ITS1-721 and ITS1-779, numbers correspond to nucleotidic position within the ITS1) were designed to delineate, by northern blot, the 3'-end of the 21S-C intermediate seen in the absence of bystin. The 21S-C RNA is detected with probe ITS1-605, but not with probes hybridizing downstream in the ITS-1 (see position of the probes in D). (B) Schematic representation of the 21S and 21S-C pre-rRNA species and position of the probes. (C) The ITS1-721 and ITS2 probe do not reveal any large species that would be complementary to the 21S-C pre-rRNA, but show disappearance of the 36S pre-rRNA upon bystin deletion. (D) Formation of the 36S pre-rRNA. (E) 3' RACE analysis with primer ITS1-583 shows accumulation of species ending around position 635 and 650 of the ITS1 in bystin-depleted cells. These species are also found in control cells.

However, no pre-rRNA migrating above the 32S RNA was revealed with the ITS1-721 or the ITS2 probes in bystin-depleted cells (Figure 4C). We observed with these probes the disappearance of the 36S pre-rRNA (Figure 4C), a rare precursor that forms upon direct cleavage of early precursors at site E (Figure 4D), which confirms that bystin depletion blocks cleavage at site E.

To further delineate the 3'-end of the 21S-C pre-rRNA, we performed 3' RACE experiments with an oligonucleotide spanning nucleotides 582–599 in the ITS1. First, an anchor oligonucleotide was ligated into the 3'-termini of RNAs isolated from whole-cell extracts in order to perform reverse transcription. RNAs with their 3'-end between nucleotide 600 and the anchor were then amplified by PCR, subcloned and sequenced. As shown in Figure 4E, we found several RNAs ending between positions 620 and 650, both in control and in bystin-deficient cells. RNAs from bystin-depleted cells were enriched in species ending around positions 635 and 650. These species were also found in wild-type cells and the heterogeneity of the 3' extremities is consistent with the often-smearly appearance of the band found below the 21S pre-rRNA on northern blots (Figure 3B). This suggests that the 21S pre-rRNA is processed by a 3'–5' exonuclease after cleavage at site 2. In this

hypothesis, the 21S-C could correspond either to the pause or the stalling of this exonuclease, or to the end product of this exonucleolytic processing.

Thus, these data show that bystin participates in efficient cleavage at site 2 and is strictly required for further processing of the 21S pre-rRNA. In addition, they uncover a new processing mechanism in the ITS1.

hTsr1 knockdown delays pre-40S particle nuclear export

In contrast to bystin, hTsr1 knockdown did not affect the levels of the 18S rRNA precursors when compared with control cells (Figure 3B). Formation of the large subunit rRNAs was not affected either, as seen on the same northern blot revealed with ITS2 probes. However, in the absence of hTsr1, the 18S/28S rRNA ratio strongly decreased, confirming the impact of hTsr1 depletion on 40S ribosomal subunit formation observed by sucrose-gradient analyses. These data indicate that hTsr1 performs a late function in 18S rRNA maturation and that hTsr1-deficient pre-40S particles are rapidly turned over.

We next analyzed the impact of hTsr1 and bystin knockdown on the intracellular fate of pre-ribosomes by FISH, using probes complementary to transcribed spacers 5'-ETS/ETS1, ITS1 and ITS2 (Figure 5). We included in

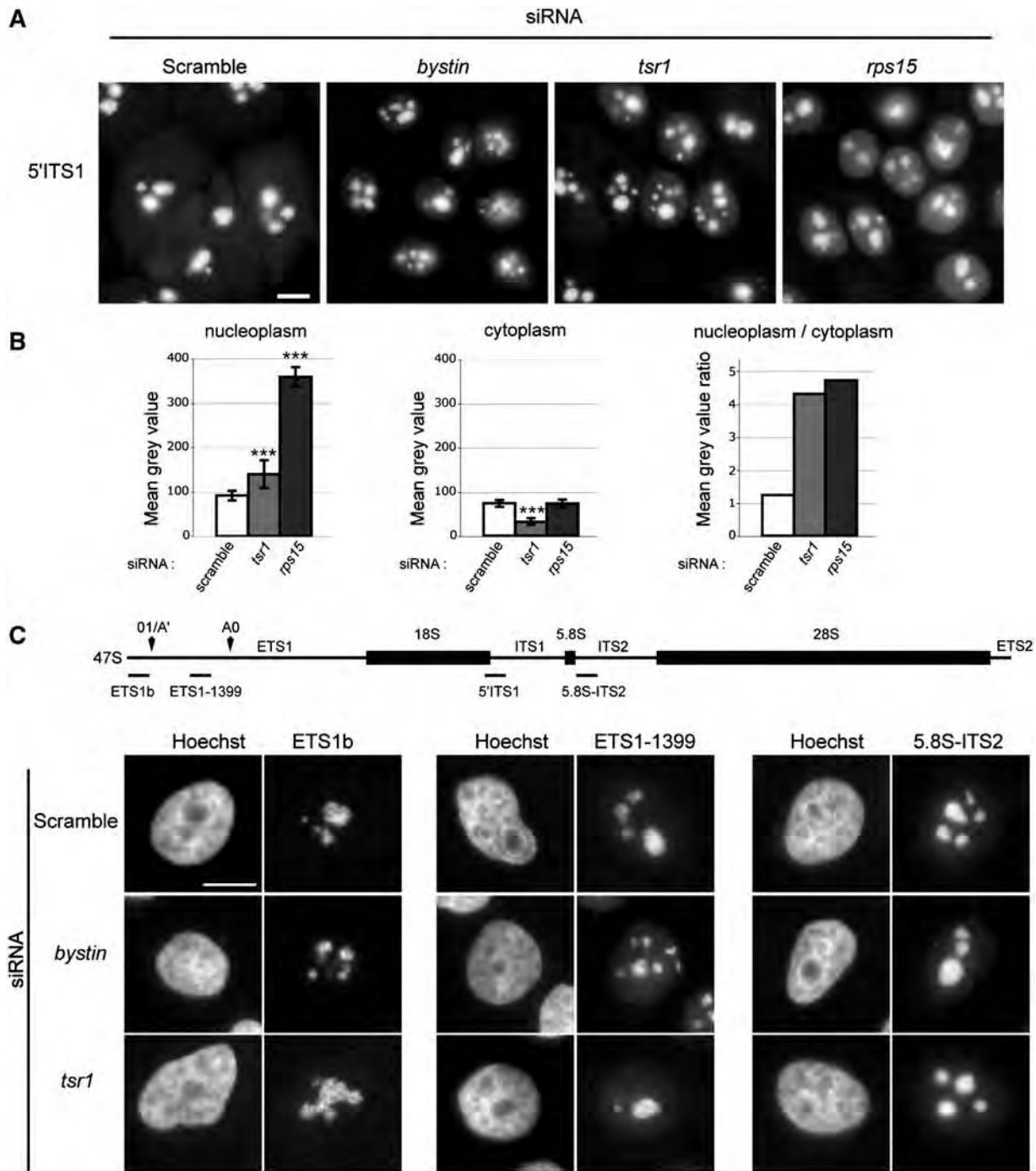


Figure 5. Localization of pre-rRNAs by FISH in *bystin*- or *hTsr1*-depleted cells. (A) HeLa cells transfected for 48 h with *bystin*, *tsr1* or *rps15* siRNAs were fixed, hybridized with the 5'ITS1 probe labeled with Cy3 and counterstained with Hoechst 33342. Precursors to the 18S rRNA accumulate in the nucleolus upon *bystin* depletion, whereas they are found in the whole nucleus in *hTsr1* and *RPS15* depleted cells. Bar = 10 μ m. (B) Nucleoplasmic accumulation of pre-40S particles after *hTsr1* and *RPS15* knockdown was measured on a minimum of 30 cells in each condition. Intensity of the FISH labeling (average gray value) was quantified in eight regions of interest, equally dispatched upon the nucleoplasm and the cytoplasm. The graph on the right shows an increase of the labeling ratio between nucleoplasm and cytoplasm in *hTsr1* and *RPS15* depleted cells. In *bystin*-depleted cells, the presence of bright nucleoplasmic dots made it difficult to reliably quantify fluorescence in the nucleoplasm. *** $P < 0.001$. (C) HeLa cells transfected for 48 h with *bystin*, *tsr1* or *rps15* siRNAs were hybridized with the 5.8S-ITS2 probe labeled with Cy3, the ETS1b or the ETS1-1399 probe labeled with Cy5. The schematic shows position of the sequences complementary to the probes in the pre-rRNA. Bar = 10 μ m.

these experiments cells depleted of RPS15, a ribosomal protein required for nuclear export (15). With the 5'ITS1 probe, cells treated with scrambled siRNAs displayed a strong nucleolar labeling characteristic of the early pre-rRNA species, as well as a cytoplasmic signal indicating the presence in this compartment of 18S-E pre-rRNA, the last precursor to the 18S rRNA (Figure 5A). The labeling level of the nucleoplasm was comparatively weak, attesting rapid trafficking of pre-ribosomal particles through this compartment. In bystin-depleted cells, cytoplasmic labeling decreased whereas nucleoli were conspicuously brighter than in control cells, suggesting accumulation of pre-40S particles in this domain. In addition, nucleoplasmic foci were observed in ~50% of bystin-depleted cells, as previously reported after knockdown of RPS19 or RPS24 (44,45). Using probes complementary to the 5' ETS, no significant differences were detected in bystin-depleted cells compared with control cells (Figure 5C): this suggests that transcription and early pre-rRNA maturation are not affected, which is in accordance with the northern blot results.

In hTsr1-depleted cells, nucleolar labeling was also more intense. In addition, fluorescence was detected in the whole nucleoplasm, similar to that observed in RPS15-depleted cells (Figure 5A), indicating that, in the absence of hTsr1, pre-ribosomal particles are retained in the nucleus. In parallel, the cytoplasm showed almost no fluorescence. This change in pre-40S particle distribution was attested by quantification of the fluorescence signal (Figure 5B). Nucleoplasmic retention in cells depleted of hTsr1 was specific of the late pre-40S particles, as it was not observed with the probes complementary to the 5' ETS (Figure 5C).

To strengthen these data, we performed subcellular fractionation followed by northern blot analysis (Figure 6A). Consistent with FISH, the nuclear fraction was enriched in 18S-E pre-rRNA upon hTsr1 knockdown (Figure 6B). In bystin-depleted cells, the nuclear fraction was enriched with 41S, 21S and 21S-C pre-rRNAs, whereas the level of 18S-E pre-rRNA decreased, both in the nuclear and in the cytoplasmic fractions. However, the nuclear and cytoplasmic distribution of the 18S-E pre-rRNA still produced in bystin-depleted cells did not change (Figure 6B). These data show that assembly of hTsr1 is required for normal trafficking of pre-40S particles from the nucleus to the cytoplasm.

DISCUSSION

The data presented here indicate that bystin and hTsr1 are required at distinct steps of the pathway: bystin is necessary for efficient cleavage of the ITS1 at site 2 and for further processing of the pre-rRNA; hTsr1 is involved downstream in nuclear export of the pre-40S particles and potentially in final cytoplasmic processing.

Yeast Enp1p is a nuclear protein, concentrated in the nucleolus. This pre-ribosomal factor is required for the earliest cleavages at sites A₀, A₁ and A₂ of the 35S pre-rRNA. Enp1p associates with pre-ribosomes from the 90S particle to the cytoplasmic pre-40S particles (17).

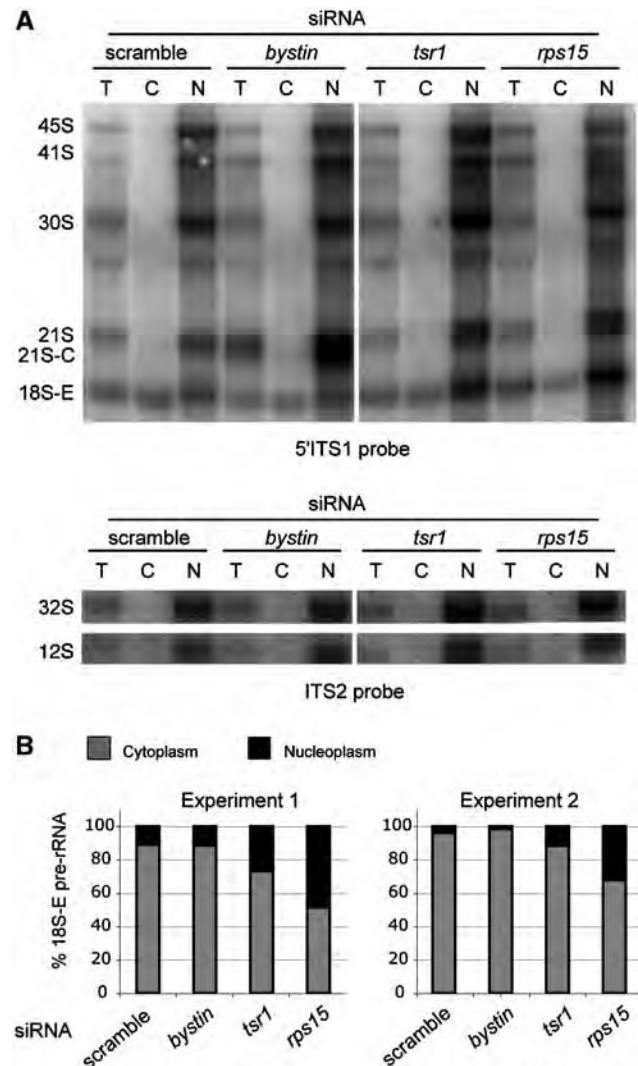


Figure 6. Nuclear retention of pre-40S particle upon depletion of hTsr1. (A) Northern blot analyses of total (T), cytoplasmic (C) or nuclear (N) pre-rRNAs, extracted from cells transfected with bystin, tsr1 or rps15 siRNAs for 48h. RNAs were revealed either with the 5'ITS1 probe or a mixture of ITS2b and ITS2d/e probes. A scramble siRNA was used as a negative control. The cytoplasmic fraction shows no contamination with nuclear pre-rRNAs. (B) The amount of 18S-E pre-rRNA in the cytoplasmic and the nuclear fractions was quantified by phosphorimaging. The histograms show the percentage of 18S-E pre-rRNA found in both fractions in two independent experiments, as calculated from the balance of the whole fractionation procedure.

Depletion of Enp1p affects cleavage of the ETS1 at sites A₀ and A₁ and blocks processing of the ITS1 at site A₂. Alternative cleavage in the ITS1 at site A₃ generates the 23S and 21S aberrant intermediates, whereas 20S pre-rRNA production is blocked (21).

Here, we find that the bystin/hEnp1 human protein is also implicated in pre-40S particle maturation. It is largely located in the nucleus and accumulates in the nucleolus, but it also accompanies the pre-40S particles to the cytosol. Our results confirm previous studies on the intracellular localization of bystin, its presence in pre-40S particles (26,40), and its involvement in ITS1 maturation (38,40). We extend these observations by showing that

depletion of bystin leads to an accumulation of the 41S and 21S pre-rRNAs, which we interpret as a delay in ITS1 cleavage at site 2 and a blockade of ITS1 processing in the pre-40S particles. In addition, a short form of the 21S pre-rRNA accumulates. Given that this species is also detected at low levels in control cells, we think that it could be a short-lived intermediate between the 21S and 18S-E pre-rRNAs. Interestingly, a similar pre-rRNA is observed in human cells upon knockdown of ribosomal protein RPS19 (43), a protein whose depletion in yeast also results in cleavage at site A₃ instead of A₂ and strongly blocks ITS1 maturation in pre-40S particles. The presence of 21S-C pre-rRNA could indicate an alternative endonucleolytic cleavage in the ITS1 preferentially used upon deficient cleavage at site 2. However, we did not detect any cleavage product complementary to the 21S-C pre-rRNA by northern blot. In addition, the heterogeneity of the RNA 3' extremities found in this region by 3'-RACE experiments, together with the fuzzy appearance of this band on northern blots, rather suggest that an exonuclease trims the 21S pre-rRNA after cleavage at site 2. We cannot exclude that this exonuclease is part of a degradation process triggered by the accumulation of 21S pre-rRNA in bystin-depleted cells. However, the presence in control cells of intermediates similar to those found upon bystin knockdown rather supports that this exonucleolytic processing is part of the 21S to 18S-E pre-rRNA conversion and constitutes an additional step in the maturation of the human pre-40S particles.

Accumulation of 21S pre-rRNA as well as disappearance of 36S pre-rRNA upon bystin depletion indicate that bystin is required for cleavage at site E. Processing at site E also requires some RPS proteins, especially RPS18 and RPS19 (46). That RPS19 and bystin depletion yields similar phenotypes may indicate that RPS19 is required for recruitment of bystin to pre-40S particles, as observed in yeast (47). Interestingly, *Enp1p* and *Rps19p* in yeast are necessary for ITS1 cleavage at site A2. This draws an interesting parallel between yeast site A2 and human site E, although they are, respectively, positioned at 217 nt and ~24 nt from the 18S rRNA 3'-end. Similar to site A2, cleavage at site E seems to be dependent on processing of the 5'-ETS, as seen upon depletion of some RPS proteins (45,46). Human site 2 in turn is independent of 5'-ETS processing, like site A3 in yeast.

The role of bystin in ITS1 processing and its association with pre-40S particles indicate that it is a true functional ortholog of yeast *Enp1p*. However, bystin does not complement a yeast *enp1* null mutant (21). This may be due to the strong divergence of the N-terminal domains of these proteins, which could be required for species-specific functions. In addition, we find no evidence that bystin/hEnp1 is implicated in 5'-ETS maturation, which may be a significant difference in the functions of these proteins.

Yeast *Tsr1p* localizes to the cytoplasm and the nucleus, including the nucleolus. It associates specifically with pre-40S particles, as indicated by its sole interaction with 20S pre-rRNA and pre-40S-specific factors (27,29). *Tsr1p* (Twenty-S rRNA) was named due to the large accumulation of 20S pre-rRNA resulting from depletion of this

factor (22,29); when detected by FISH, pre-40S particles are found to pile-up in the cytoplasm (29).

The 40S/60S subunits imbalance detected here on sucrose gradients, confirmed by the reduction of the 18S/28S ratio, argues for a major role of hTsr1 function in 40S subunit production. However, unlike in yeast, we observed no major accumulation of pre-rRNAs in the cytoplasm of HeLa cells treated with *tsr1* siRNAs, but instead nucleoplasmic retention of pre-40S particles. This discrepancy may correspond to different coordination between pre-rRNA maturation and nuclear export of pre-40S particles in yeast and mammalian cells. Indeed, production of 18S rRNA requires two pre-rRNA processing steps in human pre-40S particles instead of one in yeast. Our results indicate that hTsr1 is not necessary for the first step, i.e. conversion of 21S to 18S-E pre-rRNA. By analogy with yeast *Tsr1p*, hTsr1 may thus be involved in the final cytoplasmic processing step. But prior to this second processing step, assembly of hTsr1 is required for efficient nuclear export. Whether hTsr1 has a direct role in pre-ribosomal transport to the cytoplasm, for example, as an exportin adaptor, remains to be demonstrated. We found no leucine-rich nuclear export sequence in hTsr1 by computer search, unlike recently shown for hRio2 (26). This does not formally exclude the presence of such a sequence, given the weak consensus by which it is defined. The absence in the mammalian orthologs of Mex67p and Mtr2p of a loop critical for the function of these factors in yeast pre-60S particle nuclear export illustrates that pre-ribosomal transport has evolved between yeast and mammals (48). Alternatively, hTsr1 may be more indirectly required for correct assembly or folding of the pre-40S particles prior to nuclear export. The fact that 18S-E pre-rRNA does not accumulate in hTsr1-depleted cells suggests that hTsr1-deficient pre-40S particles are very labile and more rapidly degraded in mammalian cells than in yeast.

In conclusion, these data illustrate that, although the pre-40S particle-specific factors have clear functional homologies, maturation and nuclear export of these particles are not governed by strictly similar mechanisms in yeast and human cells. We propose that this is linked to differences in ITS1 processing, which change the timing between the maturation of the particle and its competence for nuclear export. In addition, the potential additional pre-rRNA processing step revealed upon knockdown of bystin or RPS19 indicate that nuclear processing of the ITS1 in mammalian cells may be even more complex than currently envisioned.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Guillaume Stahl, Célia Plisson-Chastang and Milena Preti for scientific discussions, as well as Ulrike Kutay and Sébastien Fribourg for sharing reagents. They are also indebted to Caroline Monod for proofreading the manuscript. C.C. designed and performed most of the experiments, M.-F.O'D. and V.C. and M.F. performed some of the experiments.

P.-E.G. supervised the project. C.C., M.-F.O'D. and P.-E.G. were involved in writing the manuscript.

FUNDING

CNRS, the University of Toulouse and the French National Research Agency (ANR – RIBEUC project); P.E.G. is a fellow of the Institut Universitaire de France; doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (to C.C.). Funding for open access charge: CNRS.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Fatica,A. and Tollervey,D. (2002) Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 313–318.
- Fromont-Racine,M., Senger,B., Saveanu,C. and Fasiolo,F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, **313**, 17–42.
- Schafer,T., Strauss,D., Petfalski,E., Tollervey,D. and Hurt,E. (2003) The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.*, **22**, 1370–1380.
- Tschochner,H. and Hurt,E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.*, **13**, 255–263.
- Milkereit,P., Kuhn,H., Gas,N. and Tschochner,H. (2003) The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 799–804.
- Li,Z., Lee,I., Moradi,E., Hung,N.J., Johnson,A.W. and Marcotte,E.M. (2009) Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biol.*, **7**, e1000213.
- Dragon,F., Gallagher,J.E., Compagnone-Post,P.A., Mitchell,B.M., Porwancher,K.A., Wehner,K.A., Wormsley,S., Settlege,R.E., Shabanowitz,J., Osheim,Y. *et al.* (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, **417**, 967–970.
- Eichler,D.C. and Craig,N. (1994) Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **49**, 197–239.
- Venema,J. and Tollervey,D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 261–311.
- Maden,B.E. (1990) The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **39**, 241–303.
- Kiss,T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, **109**, 145–148.
- Granneman,S. and Baserga,S.J. (2004) Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp. Cell Res.*, **296**, 43–50.
- Udem,S.A. and Warner,J.R. (1973) The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1412–1416.
- Vanrobays,E., Gleizes,P.E., Bousquet-Antonelli,C., Noaillac-Depeyre,J., Caizergues-Ferrer,M. and Gelugne,J.P. (2001) Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO J.*, **20**, 4204–4213.
- Rouquette,J., Choismel,V. and Gleizes,P.E. (2005) Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J.*, **24**, 2862–2872.
- Thomson,E. and Tollervey,D. (2010) The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 976–984.
- Grandi,P., Rybin,V., Bassler,J., Petfalski,E., Strauss,D., Marzioch,M., Schafer,T., Kuster,B., Tschochner,H., Tollervey,D. *et al.* (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell*, **10**, 105–115.
- Nissan,T.A., Bassler,J., Petfalski,E., Tollervey,D. and Hurt,E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.*, **21**, 5539–5547.
- Saveanu,C., Namane,A., Gleizes,P.E., Lebreton,A., Rousselle,J.C., Noaillac-Depeyre,J., Gas,N., Jacquier,A. and Fromont-Racine,M. (2003) Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4449–4460.
- Lafontaine,D., Vandenhautte,J. and Tollervey,D. (1995) The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev.*, **9**, 2470–2481.
- Chen,W., Bucaria,J., Band,D.A., Sutton,A. and Sternglanz,R. (2003) Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 690–699.
- Gelperin,D., Horton,L., Beckman,J., Hensold,J. and Lemmon,S.K. (2001) Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA*, **7**, 1268–1283.
- Wegierski,T., Billy,E., Nasr,F. and Filipowicz,W. (2001) Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *RNA*, **7**, 1254–1267.
- Oeffinger,M., Dlakic,M. and Tollervey,D. (2004) A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.*, **18**, 196–209.
- Seiser,R.M., Sundberg,A.E., Wollam,B.J., Zobel-Thropp,P., Baldwin,K., Spector,M.D. and Lycan,D.E. (2006) Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 679–691.
- Zemp,I., Wild,T., O'Donohue,M.F., Wandrey,F., Widmann,B., Gleizes,P.E. and Kutay,U. (2009) Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J. Cell Biol.*, **185**, 1167–1180.
- Schafer,T., Maco,B., Petfalski,E., Tollervey,D., Bottcher,B., Aebi,U. and Hurt,E. (2006) Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, **441**, 651–655.
- Vanrobays,E., Gelugne,J.P., Gleizes,P.E. and Caizergues-Ferrer,M. (2003) Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 2083–2095.
- Leger-Silvestre,I., Milkereit,P., Ferreira-Cerca,S., Saveanu,C., Rousselle,J.C., Choismel,V., Guinefoleau,C., Gas,N. and Gleizes,P.E. (2004) The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.*, **23**, 2336–2347.
- Fatica,A., Oeffinger,M., Dlakic,M. and Tollervey,D. (2003) Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 1798–1807.
- Fatica,A., Tollervey,D. and Dlakic,M. (2004) PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA*, **10**, 1698–1701.
- Lamanna,A.C. and Karbstein,K. (2009) Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 14259–14264.
- Pertschy,B., Schneider,C., Gnadig,M., Schafer,T., Tollervey,D. and Hurt,E. (2009) RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfl1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35079–35091.
- Suzuki,N., Zara,J., Sato,T., Ong,E., Bakhiet,N., Oshima,R.G., Watson,K.L. and Fukuda,M.N. (1998) A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tustin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 5027–5032.
- Suzuki,N., Nakayama,J., Shih,I.M., Aoki,D., Nozawa,S. and Fukuda,M.N. (1999) Expression of trophinin, tustin, and bystin by trophoblast and endometrial cells in human placenta. *Biol. Reprod.*, **60**, 621–627.
- Nadano,D., Nakayama,J., Matsuzawa,S., Sato,T.A., Matsuda,T. and Fukuda,M.N. (2002) Human tustin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochem. J.*, **364**, 669–677.
- Aoki,R., Suzuki,N., Paria,B.C., Sugihara,K., Akama,T.O., Raab,G., Miyoshi,M., Nadano,D. and Fukuda,M.N. (2006)

- The Bysl gene product, bystin, is essential for survival of mouse embryos. *FEBS Lett.*, **580**, 6062–6068.
38. Adachi,K., Soeta-Saneyoshi,C., Sagara,H. and Iwakura,Y. (2007) Crucial role of Bysl in mammalian preimplantation development as an integral factor for 40S ribosome biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 2202–2214.
 39. Wang,H., Xiao,W., Zhou,Q., Chen,Y., Yang,S., Sheng,J., Yin,Y., Fan,J. and Zhou,J. (2009) Bystin-like protein is upregulated in hepatocellular carcinoma and required for nucleogenesis in cancer cell proliferation. *Cell Res.*, **19**, 1150–1164.
 40. Miyoshi,M., Okajima,T., Matsuda,T., Fukuda,M.N. and Nadano,D. (2007) Bystin in human cancer cells: intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem. J.*, **404**, 373–381.
 41. Kiss,T. and Filipowicz,W. (1993) Small nucleolar RNAs encoded by introns of the human cell cycle regulatory gene RCC1. *EMBO J.*, **12**, 2913–2920.
 42. Dousset,T., Wang,C., Verheggen,C., Chen,D., Hernandez-Verdun,D. and Huang,S. (2000) Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2705–2717.
 43. Idol,R.A., Robledo,S., Du,H.Y., Crimmins,D.L., Wilson,D.B., Ladenson,J.H., Bessler,M. and Mason,P.J. (2007) Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells Mol. Dis.*, **39**, 35–43.
 44. Choemmel,V., Bacqueville,D., Rouquette,J., Noaillac-Depeyre,J., Fribourg,S., Cretien,A., Leblanc,T., Tchernia,G., Da Costa,L. and Gleizes,P.E. (2007) Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, **109**, 1275–1283.
 45. Choemmel,V., Fribourg,S., Aguisa-Toure,A.H., Pinaud,N., Legrand,P., Gazda,H.T. and Gleizes,P.E. (2008) Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1253–1263.
 46. O'Donohue,M.F., Choemmel,V., Faubladiet,M., Fichant,G. and Gleizes,P.E. (2010) Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian ribosomal 40S subunits (in press).
 47. Leger-Silvestre,I., Caffrey,J.M., Dawaliby,R., Alvarez-Arias,D.A., Gas,N., Bertolone,S.J., Gleizes,P.E. and Ellis,S.R. (2005) Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J. Biol. Chem.*, **280**, 38177–38185.
 48. Yao,W., Roser,D., Kohler,A., Bradatsch,B., Bassler,J. and Hurt,E. (2007) Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol. Cell*, **26**, 51–62.

II – Conclusion

Dans cette étude, nous avons donc mis en évidence que bystine et hTsr1 présentent des homologues claires de fonction par rapport à leur homologue de levure. Néanmoins, l'étude de ces 2 facteurs pré-ribosomiques a permis de révéler une étape supplémentaire de maturation des pré-ARNr de la petite sous-unité ainsi qu'un couplage différent de la maturation et de l'export des particules pré-40S chez l'homme par rapport à la levure.

L'implication de la bystine dans la biogenèse des ribosomes avait précédemment été décrite par Miyoshi *et al.* et Adachi *et al.* en 2007. Ces 2 études avaient conclu au besoin de la bystine pour une production normale de sous-unités 40S mais leurs données sur les stades précis auxquels cette protéine était requise restaient imprécises, ne mettant pas en évidence la présence du pré-ARNr 21S-C par exemple. Les données amenées ici précisent donc l'implication de ce facteur pour un clivage efficace au site 2 dans l'ITS1 ainsi que pour les séquences suivantes de maturation de l'ITS1.

Par ailleurs, l'existence du nouvel intermédiaire de maturation issu du pré-ARNr 21S avait aussi été préalablement décrite lors d'une étude sur RPS19 (Idol *et al.*, 2007). Nous avons cependant décidé d'appeler cet intermédiaire le pré-ARNr 21S-C (pour 21S-Court) et non le pré-ARNr 20S afin de le distinguer du pré-ARNr 20S présent chez la levure. En effet, l'extrémité 3' du pré-ARNr 20S de levure correspond au site 2 de clivage dans l'ITS1, et donc serait l'équivalent du pré-ARNr 21S humain. Par ailleurs, nos expériences de Northern blot menées afin de déterminer l'extrémité 3' de cet intermédiaire ont montré des résultats différents de ceux obtenus par Idol *et al.* En effet, dans l'étude menée par ce groupe, l'extrémité 3' de l'intermédiaire 21S-C observée se situerait entre les nucléotides 755 et 766 de l'ITS1. Or nos expériences ont montré que cette extrémité se situait entre les nucléotides 620 et 655 de l'ITS1. Toutefois, en analysant de plus près les Northern blot dans la publication de Idol *et al.*, nous pouvons observer que la bande correspondant au pré-ARNr

21S-C est révélée avec une sonde 5'ITS1 (sonde i) mais que la sonde s'hybridant au niveau des nucléotides 754 de l'ITS1 (sonde ff) révèle plutôt une traînée sous le pré-ARNr 21S, et non une bande spécifique qui correspondrait au pré-ARNr 21S-C. Cette observation soutient notre hypothèse sur l'action d'une exonucléase pour la maturation du pré-ARNr 21S en pré-ARNr 21S-C.

III – Résultats complémentaires

Un des buts de ma thèse était de déterminer la fonction de ces facteurs dans la biogenèse des ribosomes afin de les utiliser en tant qu'outils pour la caractérisation de la composition protéique des particules pré-ribosomiques à différentes étapes de leur maturation.

Ne disposant pas d'anticorps spécifique de ces protéines, Bystine et hTsr1 ont été étiquetées avec 3 Flag en position N-ter afin de réaliser des immunoprécipitations de ces facteurs. L'analyse des particules associées à ces facteurs en conditions normales ou suite à des défauts de la maturation de la petite sous-unité à différentes étapes de sa biogenèse aurait permis de déterminer la dynamique d'association de protéines au cours du processus de maturation. Dans ce but, des lignées stables exprimant Flag-Bystine ou Flag-hTsr1 ont été construites. Cependant, la mise en évidence de la fonctionnalité des protéines étiquetées s'est révélée ardue. Les différentes techniques mises en place n'ont pas permis de confirmer ou d'infirmer l'intégration de ces facteurs étiquetés au sein des particules pré-ribosomiques.

Lors de la localisation de ces protéines étiquetées sur des gradients de saccharose à partir de fractions cytoplasmique ou nucléaire, une grande proportion de la protéine se trouvait dans la fraction libre. L'observation d'un pic spécifique au niveau des sous-unités 40S ou des particules pré-40S n'était pas reproductible d'une expérience à l'autre.

Afin de déterminer si ces 2 protéines étiquetées étaient incorporées dans les particules pré-40S, d'autres techniques ont été utilisées, comme l'immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le Flag. Les pré-ARNr associés ont ensuite été analysés par Northern Blot ou par RT-PCR, mais les résultats n'ont pas permis de donner une conclusion claire quant à la fonctionnalité de ces 2 facteurs étiquetés.

B – La dynamique des corps pré-nucléolaires en fin de mitose dépend de la reprise de la maturation des ARNr pré-ribosomiques.

L'étude de la fonction de la bystine a dévoilé un phénotype particulier, qui avait précédemment été observé suite à la perte d'expression de RPS19 et RPS24 ainsi que lors du cribble systématique des protéines ribosomiques de la petite sous-unité (Choismel *et al.*, 2007; Choismel *et al.*, 2008; Doherty *et al.*, 2010). Les cellules n'exprimant pas une de ces protéines présentent des spots nucléoplasmiques lors d'expériences de FISH avec une sonde s'hybridant à cheval sur l'extrémité 3' de l'ARNr 18S et sur l'extrémité 5' de l'ITS1 (sonde 5'ITS1).

Ces spots nucléoplasmiques sont observables suite à la perte d'expression de 13 protéines ribosomiques¹, faisant partie des i-RPS ou des p-RPS, ainsi que d'un facteur pré-ribosomique, bystine. La taille et la disposition péri-membranaire dans le nucléoplasme de ces spots nous ont permis d'émettre l'hypothèse que ces spots pouvaient correspondre à des corps pré-nucléolaires (ou PNB pour Pre-Nucleolar Bodies). Dans ce but, nous avons regardé si ces spots marqués par une sonde 5'ITS1 étaient également révélés avec la protéine B23 étiquetée avec la GFP, dans une lignée stable exprimant cette protéine fluorescente. Les spots contenant des pré-ARNr sont enrichis en B23-GFP. L'analyse de l'origine de ces foci par microscopie en temps réel ainsi que de la structure de ces spots par CLEM (« Correlative Light-Electron Microscopy ») nous ont permis de déterminer la nature de ces spots, qui correspondent donc à des corps pré-nucléolaires qui ne se résorbent pas en G1. De plus, ce phénotype de PNBs résiduels est corrélé avec un délai ou un arrêt des cellules en G1.

¹ : RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS11, RPS13 et RPS24 pour les i-RPS ; et RPS18, RPS19, RPS20, RPS27A et RPS29 pour les p-RPS.

Ces PNBs résiduels soient observables après des défauts précoces ou tardifs de biogenèse des ribosomes nous a permis de proposer l'hypothèse que la nature des pré-ARNr présents dans ces corps dépendait du défaut induit. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des foci de la même nature sont observables seulement avec une sonde s'hybridant à l'ITS2, suite à un défaut de la biogenèse de la grande sous-unité. Afin de pouvoir infirmer ou confirmer cette hypothèse, la nature des pré-ARNr présents dans ces PNBs résiduels (ou rPNBs pour *residual*-PNBs), suite à des défauts précoces, intermédiaires ou tardifs de biogenèse des ribosomes, a été analysée grâce à des combinaisons de sondes permettant de discriminer entre les différents précurseurs des ARNr. Suite à un défaut tardif (perte de l'expression de RPS29 par exemple), seuls les précurseurs les plus tardifs, les pré-ARNr 21S et 18S-E, sont observés dans les rPNBs, tandis que des espèces plus précoces, comme le pré-ARNr 45S, sont présentes dans ces foci suite à la perte de l'expression de RPS24, une i-RPS. Les pré-ARNr présents dans les rPNBs correspondent donc aux pré-ARNr qui sont bloqués dans leur maturation suite à la perte d'expression d'une protéine ribosomique des sous-unité 40S ou 60S.

Suite à ces résultats, nous avons proposé que la résorption des PNBs en condition normale est dépendante de la reprise de la maturation des pré-ARNr et que cette maturation ne devait pas être défectueuse. Cette hypothèse est soutenue par les différentes descriptions de la séquentialité de disparition des PNBs des protéines nucléolaires. En effet, il a été montré que l'ordre de disparition de ces protéines dépend du stade auquel elles interviennent au sein de la biogenèse des ribosomes. Les protéines qui quittent le plus rapidement les PNBs pour rejoindre les nucléoles nouvellement formés correspondent à celles qui sont requises pour les étapes précoces, tandis que les protéines intervenant plus tardivement quittent les PNBs dans un second temps (Dundr *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2004; Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001). Nous avons donc analysé la présence des différentes espèces de pré-ARNr de la petite sous-unité dans les PNBs selon la phase de la

mitose. Les pré-ARNr les plus précoces (les pré-ARNr 45S et 30S, révélés par la sonde ETS1-1399) disparaissent plus vite des PNBs que les pré-ARNr plus tardifs (les pré-ARNr 21S et 18S-E, révélés par les sondes 5'ITS1 et ITS1-160). Par ailleurs, les intermédiaires de maturation des ARNr 5,8S et 28S (révélés par la sonde ITS2) résident plus longtemps au sein des PNBs que les pré-ARNr spécifiques de la petite sous-unité. Les PNBs les plus tardifs dans les cellules contiendraient donc seulement des particules pré-60S.

En conclusion, les particules pré-ribosomiques qui étaient en cours de maturation avant le début de la mitose se regroupaient dans les PNBs lors de la télophase. La reprise de maturation de ces particules aurait lieu dans ces structures, permettant la libération séquentielle des facteurs impliqués dans cette maturation selon leur stade d'implication. Ces différentes protéines pourraient alors rejoindre les nucléoles nouvellement formés pour jouer à nouveau leur rôle au sein des particules pré-ribosomiques dont la synthèse a repris.

I – Résultats

Dynamics of pre-nucleolar bodies at the end of mitosis is driven by pre-ribosomal RNA processing

Coralie Carron, Stéphanie Balor, Marlène Faubladié, Pierre-Emmanuel Gleizes, Marie-Françoise O'Donohue

Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, F-31000 Toulouse, France

CNRS, LBME, F-31000 Toulouse, France

Correspondence to Pierre-Emmanuel Gleizes (tel: +33-561 335 927; gleizes@ibcg.biotoul.fr)

Keywords: ribosome biogenesis, *Homo sapiens*, pre-ribosomal RNA processing, pre-nucleolar bodies, G1 arrest, cell cycle

ABSTRACT

We have previously observed that depletion of the Diamond-Blackfan anemia-linked ribosomal proteins RPS19 or RPS24 induces formation of nuclear foci containing pre-ribosomal RNAs. We now show that these foci correspond to pre-nucleolar bodies that do not resorb after mitosis, which is correlated with a strong delay in G1 phase. This phenomenon is observed when affecting a wide range of ribosomal proteins, as well as the assembly factor bystin/ENP1. Presence in these foci of early assembly factors and of pre-rRNAs whose nature is directly related to the induced processing defect strongly indicates that residual PNBs contain pre-ribosomal particles blocked in their maturation. In parallel, we showed that composition of PNBs in untreated cells evolves from early pre-rRNAs in anaphase/telophase to late pre-rRNAs in early G1. We infer from these results that resorption of PNBs in post-mitotic cells is driven by the maturation of the pre-ribosomal particles that they contain.

Number of words: 148

INTRODUCTION

In eukaryotes, transcription of rDNA, pre-rRNA processing and assembly of the four rRNAs with the ribosomal proteins mostly take place in the nucleolus. Transcription of rDNA genes leads to a large polycistronic precursor, called 47S pre-rRNA in vertebrates, which contains the sequences of the 18S, 5.8S and 28S rRNAs, flanked by external and internal spacers (ETSs and ITSs). A subset of ribosomal proteins and pre-ribosomal factor assemble co-transcriptionally with the 47S pre-rRNAs, forming the 90S pre-ribosomal particle. Electron microscopic studies have established a link between these early processes and two nucleolar structural sub-domains, the fibrillar centers (FCs) and the surrounding dense fibrillar component (DFC) (reviewed in (Hadjiolov, 1985, Thiry et al., 2000)). The pre-ribosomal particles undergo further maturation steps in the granular component (GC), in order to progressively remove ETS and ITS sequences through endonucleolytic cleavages or exonucleolytic processing (Figure 1) (Hadjiolov, 1985, Eichler and Craig, 1994). Cleavage of the ITS1 at site 2 splits the 90S particle into a pre-40S and a pre-60S ribosomal particle, which then follow distinct maturation pathways. After export into the cytoplasm, the final processing steps take place, leading to the two mature ribosomal subunits (Rouquette et al., 2005). From the neo-synthesized 47S pre-rRNA to the ultimate maturation steps of the pre-40S and pre-60S particles, over a hundred pre-ribosomal factors are sequentially involved through an intricate ballet of assembly and disassembly steps, as shown recently in yeast *S. cerevisiae* (Fatica and Tollervey, 2002, Kressler et al., 2010).

Both rDNA transcription and processing of pre-ribosomal particles are switched off at the onset of mitosis and are progressively reactivated in telophase. In prophase, the transcription of rDNA by RNA polymerase I is inhibited through several phosphorylations of its co-factors by the CDK1/cyclinB complex (Heix et al., 1998, Sirri et al., 1999). During mitosis, a vast majority of the components of the transcription machinery, such as UBF and most RNA polymerase I subunits, remain associated to the rDNA genes in an inactive form, whereas other proteins transiently dissociate from the transcriptional complexes and relocate to the cytosol (Zatsepina et al., 1993,

Roussel et al., 1996, Sirri et al., 1999, Leung et al., 2004, Chen et al., 2005). Inhibition of rDNA transcription and pre-rRNA processing appear to be independently controlled (Dousset et al., 2000, Sirri et al., 2000), but the mechanism by which the latter is inhibited is still unknown.

While the pre-rRNA processing machinery is inhibited during mitosis, the presence of stable pre-rRNAs in mitotic cells has been widely described. These "mitotic" pre-rRNAs form of a perichromosomal sheath after nucleolar breakdown in prometaphase (Azum-Gelade et al., 1994, Gautier et al., 1994, Leung et al., 2004) and are found from metaphase till early G1 in distinct foci in the cytosol, called nucleolar derived foci (NDF). In telophase, the transcriptional machinery is reactivated at the NORs where nucleoli reform. Concomitantly, the perichromosomal sheath breaks down into small particles that aggregate to form pre-nucleolar bodies (PNBs). PNBs contain pre-rRNA species, snoRNAs like U3 and U14, and some pre-ribosomal factors were localized in these structures (Ochs et al., 1985, Chan et al., 1991, Roussel et al., 1993, Jimenez-Garcia et al., 1994, Dundr and Olson, 1998, Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999, Savino et al., 1999, Dundr et al., 2000, Leung et al., 2004, Thiry et al., 2009). Nucleolar proteins progressively leave PNBs to join nucleoli in late telophase and early G1 phase, as observed by live fluorescence microscopy (Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001, Leung et al., 2004, Angelier et al., 2005). Most strikingly, the release of nucleolar proteins from PNBs follows the order of their requirement in pre-rRNA processing. It has been proposed the pre-rRNAs present in PNBs could constitute a platform for the association of nucleolar pre-complexes for ribosome biogenesis (Savino et al., 2001, Angelier et al., 2005). This model of pre-ribosomal factors pooling around pre-rRNAs could account for the recruitment order according to pre-rRNA stability. However, the mechanisms underlying the dynamics of PNBs and the fate of pre-rRNAs in these structures remains speculative.

Our group has previously reported that upon depletion of some ribosomal proteins of the small ribosomal subunit, RPS19 and RPS24 (Choemmel et al., 2007, Choemmel et al., 2008), or upon knockdown of a pre-ribosomal factor, bystin (Carron et al., 2010), a large proportion of the cells displayed nucleoplasmic dots. We have now extended this observation to a large number of ribosomal proteins. We show that these nucleoplasmic dots correspond to residual PNBs that do not resorb in G1 phase. Taking advantage of this phenotype, we now demonstrate that PNB

dynamics depends on maturation of the pre-rRNAs that they contain, which is likely to be the driving force behind the ordered dispersion of PNB material in post-mitotic cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and reagents

Control human cervical carcinoma HeLa cells and stably transformed HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) in 5% CO₂ at 37°C. HeLa cells, stably expressing EGFP fused to the N-terminus of the nucleolar factor B23 (HeLa-B23 cells), were kindly provided by Dr. Hernandez-Verdun (Louvet et al., 2005).

Knockdown of protein expression

Different 21-mer siRNAs were used to knock down expression of the following human proteins: RPS5 (GenBank accession no. NM_001009): 5'-CCGAUGAUGUGCAGAUCAAdTdT-3' (siRNA *rps5*); RPS6 (GenBank accession no. NM_001010): 5'-GACGCAGACUUUCCUCUCUdTdT-3' (siRNA *rps6*); RPS19 (GenBank accession no. NM_001022): 5'-AGAGCUUGCUCUCCUACGAUdTdT-3' (siRNA *rps19*); RPS24 (GenBank accession no. NM_033022): 5'-CACCGGAUGUCAUCUUUGUdTdT-3' (siRNA *rps24*); RPS29 (GenBank accession no. NM_001032): 5'-CGGUCUGAUCCGGAAUAUdTdT-3' (siRNA *rps29*); RPL5 (GenBank accession no. NM_000969): 5'-GCCACAAUGUUGCAGAUUAdTdT-3' (siRNA *rpl5*); BYSTIN (GenBank accession no. NM_004053): 5'-CUGCCCAAGGCAUUUAAGAdTdT-3' (siRNA *bystin-1*) 5'-GAGGUUGAGACAGUCAUGUdTdT-3' (siRNA *bystin-2*). All siRNAs were purchased from Eurogentec and provided as duplexes diluted 100 µM. 10 µL of siRNA solution were added to 10⁷ HeLa cells in suspension in 200 µL of DMEM without FCS and antibiotics. For *bystin* knockdown, a mixture of 10 µL of each siRNA *bystin-1* and *bystin-2* was used. For controls, cells were electro-transformed either with a scramble siRNA or without siRNA, which lead to similar results. Electroporation was performed at 250 Volts and 970 µF with a Gene Pulser

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), in a cuvette with a 4 mm interelectrode distance. The cells were diluted in 20 mL DMEM supplemented with FCS and antibiotics and plated in a 140 cm² Petri dish for RNA extraction and Northern blot analyses. They were also seeded either on glass cover slips laid in 24 wells-microplates for FISH and immunofluorescence assays, or on glass base Petri dishes 35 mm in diameter (Dominique Dutscher, Brumath, France) for live cell imaging.

Northern blot analysis of pre-rRNA

Total RNAs were purified with Trizol reagent. After alcohol precipitation, RNA pellets were dissolved in formamide, quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and diluted 1 mg/mL. Pre-rRNA analysis by Northern blot was performed as described previously with different probes: 18S (5'-TTTACTTCCTCTAGATAGTCAAGTTCGACC-3'), 28S (5'-CCCGTTCCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATA-3'), 5'-ITS1 (5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'), ITS2b (5'-CTGCGAGGGAACCCCCAGCCGCGCA-3'), and ITS2-d/e (5'-GCGCGACGGCGGACGACACCGCGGCGTC-3') (O'Donohue et al., 2010). For detection of the ITS2, the ITS2-b and ITS2-d/e probes were mixed in equal amounts. After hybridization, the membranes were washed twice for 10 min at room temperature in 2X SSC, SDS 0.1%, and once in 1X SSC, SDS 0.1%. Labeled RNA signals were acquired with a FLA2000 PhosphorImager (Fuji, Stamford, CT) and quantified with ImageGauge software.

Labeling of cellular DNA with EdU

The number of cells, which went through S phase, was assessed by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen), an analogue of thymidine (Salic and Mitchison, 2008). HeLa cells were transfected either with a scramble siRNA or with siRNA *rps19* and grown on glass cover slips for 2 days. EdU at a final concentration of 20 µM was then added to the medium for 4 or 6 h.

At the end of the reaction time (which corresponded to 48 h post-transfection), the cells were rinsed twice in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. After several washings in PBS, cells were permeabilized for 5 min in 0.5% Triton X100 diluted in PBS. They were then rinsed twice in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA). EdU incorporated into cellular DNA was revealed by click chemistry through the reaction of its terminal alkyne group with an azide derivative coupled to Alexa594 (Invitrogen), in the presence of copper sulfate. The reaction was developed for 30 min in the presence of a mixture containing 4 mM CuSO₄, 10 μM Alexa594 azide, 2 mg/mL ascorbic acid in TBS buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The cover slips were protected from light and incubated at ambient temperature under slow agitation. The cells were then rinsed briefly in TBS buffer. Hybridization with a 5'ITS1 probe conjugated to Alexa488 was made for 4 h at 37°C in a buffer containing formamid, SSC, dextran sulfate, ribonucleoside vanadyl complexes, BSA and tRNA (O'Donohue et al., 2010). After two washes in 2X SSC containing 10% formamid, DNA was counter stained with Hoechst 33342 (Invitrogen). The cover slips were finally mounted in Mowiol 4.88 (PolyScience, Inc.).

Fluorescence in situ hybridization and immunofluorescence assays

Precursors to the 18S rRNA were localized by fluorescence in situ hybridization (FISH) in HeLa cells as described (O'Donohue et al., 2010). The following probes, conjugated to Cy3, Cy5 or Alexa488 (Invitrogen), were used: 5'ETSb (5'-AGACGAGAACGCCTGACACGCACGGCAC-3'), 5'ETS-1399 (5'-CGCTAGAGAAGGCTTTTCTC-3'), 5'ETS-18S (5'-GATCAACCAGGTAGGTAAGGTAGAGCGCGGCGA-3'), 5'-ITS1 (5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'), ITS1-159 (5'-TCTCCCTCCCGAGTTCTCGGCTCT-3'), 3'ITS1 (5'-GTCGATTTGGCGAGGGCGCTCCCGAG-3'), ITS2 (5'-GCGATTGATCGGCAAGCGACGCTC-3'), 3'ETS (5'-CGTGCGTGCGCGCGCCTGTTTGGGAAC-3'). Appropriate combinations of probes labeled with different fluorophores were chosen in order to reveal various subsets of pre-rRNA species. For

snoRNAs, the following probes were used: U3 (5'-TXGCACAGAAGCAGCACCCXAGAGCCGGCTTCACGCTXT-3') and U8 (5'-AXAGGAGCAATCAGGAXGTTGCAAGACCXGATTACGCAGAGACGXT-3'). Cells grown on glass cover slips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. After washing in PBS, the cells were permeabilized in 70% ethanol overnight at 4°C. They were then re-hydrated twice for 5 min in 2X SSC containing 10% formamid. Hybridizations in the presence of 2 to 3 different probes were performed for 4 h as described in the previous section. After two washes in 2X SSC containing 10% formamid, DNA was counter stained and the cover slips were mounted.

For immunofluorescence studies, cells grown on glass cover slips were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde in PBS. After washing in PBS, cells were permeabilized for 5 min in 0.1% Triton X-100 and 0.02% SDS in PBS. Saturation was performed for 30 min first in 2% BSA in PBS, and then in 10% normal goat serum (NGS) in PBS. The primary antibody, diluted in 10% NGS in PBS, was put in contact with the cells for 1 h at room temperature. After washing in 2% BSA in PBS, and in 10% NGS in PBS, cells were incubated with the secondary antibody coupled to Alexa488, 555 or 647 and diluted 1:400 in 10% NGS in PBS. After washing briefly in 0.1% Triton X-100 and 0.02% SDS in PBS, DNA was counter stained with Hoechst and mounting was as described above. The following antibodies were used in the present study: anti-Rio2 (1:5000), anti-Nob1 (1:5000), anti-Dim2 (1:2000) (all a gift from Dr. U. Kutay) (Zemp et al., 2009), anti-bystin (1:10000), anti-Ltv1 (1:20000) (both raised in our laboratory), and anti-fibrillarin (1:1000) (a gift of Dr. J. Cavaillé).

Light microscopy observations and time-lapse experiments

Observations of fixed cells were made with an inverted IX-81 microscope (Olympus), equipped with a motorized stage (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf, Germany) and a Coolsnap HQ camera (Photometrics, Tucson, AZ), driven by MetaMorph (Molecular Devices, Downington, PA). Cells were observed using a planapochromat X100, 1.4 numerical aperture oil immersion objective driven by a piezo z-stepper (PI). The pixel size was 64.5 nm. The light source was a Polychrome V

monochromator (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) equipped with a 150 W Xenon source and used with a 15-nm bandwidth. For multi-labeling experiments, multiband dichroic mirrors (Chroma, Rockingham, VT) were used to avoid pixel shift in the acquisition plane. Specific single-band emission filters were mounted on a motorized wheel (PI). To analyze EdU incorporation experiments by image cytometry, adjacent fields were systematically acquired in each experimental condition, until an appropriate number of cells had been reached (between 500 and 1000 cells).

Time-lapse experiments were done at 37°C on live HeLa cells stably expressing EGFP-B23, 24 h post-transfection with a scramble siRNA, siRNA *rps19* or *rps24*, or a mixture of siRNAs *bystin-1* and *bystin-2*. Images were acquired with the wide-field microscope described above with a 0.3 µm z-step. Alternatively, 3D time-lapse experiments were performed with an Andor Revolution Nipkow-disk confocal system installed on an IX-81 inverted microscope (Olympus), featuring a Yokogawa CSU22 confocal spinning disk unit and a cooled EMCCD camera (Andor). Illumination was performed by the 488-nm line of a diode pumped solid state laser (25 mW, Coherent), used at 30% of its power. With a 100X oil immersion objective (Plan Apochromat, 1.4 NA; Olympus), the pixel size was 77.3 nm. The exposure was 100 ms per plane. For comparison purposes, cells in anaphase or early telophase were selected, as the former is the shortest step of mitosis. Images were captured every 3 min for 1 h in order to follow the last steps of mitosis and early G1. Alternatively, they were acquired every 10 min for the first 3 h, and then every 30 min for up to 8 h in order to study the behavior of residual PNBs during G1 phase in siRNA-treated cells. Deconvolution and image analysis were performed with the MetaMorph software (Molecular Devices).

Correlative light-electron microscopy (CLEM) experiments

HeLa-B23 cells, transfected for 48 h with siRNAs targeting RPS or bystin, were fixed overnight at 4°C with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.2). They were collected by scrapping, centrifuged briefly and the pellet was then included in agarose. CLEM on ultrathin sections was performed as described (van Rijnsoever et al., 2008). First, cells were

cryoprotected with 3.5% sucrose and stained with uranyl acetate. They were embedded in Lowicryl HM20 in an EM automate freeze substitutor (Leica) using the Progressive Lowering of Temperature (PLT) method. Briefly, the cells were dehydrated with ethanol while decreasing the temperature from 0°C to -30°C. The samples were infiltrated with Lowicryl HM20 and ethanol and finally with pure lowicryl HM20 before UV-polymerization for 2 days at -30°C. Then, ultra-thin sections were prepared on an Ultracut microtome (Leica) and mounted on formvar-carbon-coated finder grids (EMS). For fluorescence light microscopy observations, grids were temporary mounted on a glass slide in 50% glycerol and the position of each cell of interest was determined with the alphanumerical code of the grid. Once fluorescence light microscopy imaging had been completed, samples were processed for EM observations. The grids were removed from the glass slides, extensively washed in water to remove glycerol and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Observations were made at 80 kV on a 1200-EX transmission electron microscope (Jeol). Images were acquired using a digital camera (AMT-USA) at X10000 or X100000 magnification. The set of images obtained after observation at the optical and at the electronic levels were rescaled and superimposed by using Photoshop software.

RESULTS

Nuclear foci in RPS-depleted cells correspond to residual PNBs

Depletion of ribosomal proteins RPS19 or RPS24 in HeLa cells results in formation of nucleoplasmic foci containing pre-rRNAs, as seen by FISH (Figure 2A) (Choemmel et al., 2007, Choemmel et al., 2008). This phenotype was observed in 30 to 50% of the cells depending on the experiment. Beyond these initial observations with *rps19* and *rps24* siRNAs, similar foci were detected upon knockdown of several other RPSs (Figure S1): RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS11, RPS13 and RPS24 among i-RPSs, which are required for initiation of the 40S subunit processing pathway, RPS18, RPS19, RPS20, RPS27a and RP29 among p-RPSs, which are required for progression of the 40S subunit processing pathway (O'Donohue et al., 2010). Knocking down expression of the other RPSs did not result in a similar phenotype. However, we also detected pre-rRNA containing nucleoplasmic foci upon depletion of RPL5 (Gazda et al., 2008) and of bystin/ENP1, a ribosomal factor involved in 40S subunit maturation (Carron et al., 2010). Similar foci were observed when siRNA transfection was performed in U2OS cells (not shown).

We hypothesized that these foci would be related to PNBs. To check this hypothesis, we treated HeLa cells expressing GFP-B23, a known marker of PNBs, with siRNAs inducing nucleoplasmic foci, as illustrated in Figure 2A for cells depleted of RPS19 and RPS24. Indeed, the foci containing pre-rRNAs were also enriched in GFP-B23 (Figure 2A). Localization of GFP-B23 with pre-rRNAs in these nucleoplasmic foci was reproduced with any of the siRNAs that induced this phenotype. These structures were not stained either with antibodies to coilin or PML, ruling out that they be Cajal bodies or PML bodies (data not shown). We next took advantage of the localization of GFP-B23 in these structures to investigate by time-lapse fluorescence microscopy whether these foci formed at the end of mitosis, as expected for PNBs. As shown on Figure 2B, PNBs stained with GFP-B23 were visible in control cells in early G1, but their number decreased drastically during the first hour following anaphase and disappeared completely within three hours. In contrast, numerous GFP-B23 labeled foci forming at the end of mitosis persisted for more than seven hours

after mitosis upon knockdown of bystin. As mentioned above, we checked that the foci observed with GFP-B23 were exactly the same as those detected by FISH with the 5'-ITS1 probe (not shown). Similar results were obtained in cells depleted of RPS19 or RPS24. Noticeably, the duration of mitosis itself did not appear to be significantly altered, as judged from video microscopy sequences (Figure S2).

The nucleoplasmic foci were next examined by transmission electron microscopy (TEM). To ensure that the structures observed were GFP-B23 labeled bodies, we performed correlative light-electron microscopy. HeLa cells expressing GFP-B23 were embedded in acrylic resin and ultrathin sections were observed by fluorescence microscopy to detect GFP. The nucleoli, as well as nucleoplasmic dots were readily detected in some cells. The position of these cells was recorded and the same sections were then observed by TEM. Figure 3 shows a gallery of nucleoplasmic foci spotted by fluorescence microscopy and observed by TEM. These structures were rather heterogenous in size and in appearance, and often located at the nuclear periphery. This was confirmed by 3D visualization of the data obtained by live cell imaging, in which the residual PNBs adopted a more peripheral localization as time increased (data not shown). In most cases, they appeared as dense bodies containing granules with sizes around 15 nm. Some were more fibrillar, others showed both a fibrillar and a granular domain. The fibrillogranular ultrastructure of the nucleoplasmic foci is comparable to that of PNBs previously described in various cell types like human HeLa cells (Savino et al., 2001) or monkey CMT3 cells (Dundr et al., 2000).

We conclude from these results that the nucleoplasmic foci observed in cells deficient in pre-rRNA processing correspond to residual PNBs (rPNBs) that persists in G1 phase.

Residual PNBs accumulate in cells with delayed G1 phase

We next examined the distribution through the cell cycle of cells containing nucleoplasmic foci (Figure 4). In order to distinguish G1 cells from cells in S and G2 phase, cells treated with *rps19* siRNAs for 48 h were incubated for 4 h with EdU, an analogue of thymidine. PNBs labeled with

the 5'ITS1 probe were observed in about 10% of control cells. However, 95% of these PNB-containing cells were EdU negative. We inferred from this result that most labeled cells corresponded to cells in S and G2 phase. Upon knocking down of RPS19, the proportion of PNB-labeled cells increased to 53%, but the proportion of EdU-labeled cells was low (5.9% of the PNB-containing cells). This showed that the proportion of cells in early G1 increased drastically in treated cells. When EdU incorporation was extended to 6 hours, 55% of the cells containing PNBs were also labeled by EdU in control cells. On the contrary, when RPS19 was knocked down, the level of dually-labeled cells was just over 8% of the PNB-containing cells. This showed that cells treated with *rps19* siRNA were strongly delayed in G1 phase. In addition, the proportion of EdU-labeled nuclei significantly increased with the length of incorporation in control cell, while the proportion of cells that had gone through S phase decrease slightly in treated cells. Altogether, this showed that knocking down RPS19 strongly delayed cell cycle progression. These data further support that these nucleoplasmic foci correspond to PNBs that do not resorb after mitosis and indicate that it is correlated to arrest or delay of progression through phase G1.

The pre-rRNA species present in residual PNBs differs according to the processing defects

We reasoned that rPNBs might result from the impossibility for the pre-rRNAs that they contained to be processed. A corollary of this hypothesis is that the pre-rRNAs present in rPNBs should correspond to ill-processed pre-rRNAs, and therefore vary depending on the protein knocked down. This idea was supported by the observation that knockdown of the 60S ribosomal subunit protein RPL5 induced rPNBs containing pre-rRNAs which were detected with a probe complementary to the ITS2, but not with a probe detecting the ITS1 (Figure 5A). Indeed, depletion of RPL5 prevents production of the 60S subunit, resulting in accumulation of precursors to the 28S and 5.8S rRNAs, but has little impact on 40S subunit synthesis (Gazda et al., 2008, Robledo et al., 2008). In contrast, residual PNBs in RPS29-depleted cells were labeled with the ITS1 probe but not with the ITS2 probe, indicating the presence of intermediate and late precursors to the 18S rRNA (Figure 5A). Consistently, RPS29 knockdown results in accumulation of the 21S and 18S-E intermediates in the

18S rRNA maturation pathway, two species which do not contain ITS2 (O'Donohue et al., 2010).

We next compared the pre-rRNAs in residual PNBs in cells depleted of proteins required either early in the 18S maturation pathway (RPS5, RPS6), or at intermediate and late steps (bystin and RPS19, and RPS29, respectively) (O'Donohue et al., 2010). Upon knockdown of any of these proteins, residual PNBs were visualized with probes hybridizing to the ITS1, which detect both early and late maturation intermediates (Figure 5B). However, probes complementary to the 5'-ETS only stained residual PNBs in RPS5 and RPS6 depleted cells, consistent with the accumulation of 45S and 30S pre-rRNA observed by Northern blot in these cells (Figure 5B). In contrast, no residual PNBs were detected with these probes upon knockdown of RPS19, bystin, or RPS29, which does not block 5'-ETS maturation. A probe complementary to the ITS2 also labeled residual PNBs in bystin and RPS19-depleted cells, which accumulate 41S pre-rRNA, and in RPS5- and RPS6-depleted cells, which display high levels of 45S pre-rRNAs (Figure 5B). In cells treated with *rps29* siRNAs, which delay or block maturation of the 21S and 18S-E pre-rRNAs, residual PNBs contained only late precursors. Consistent results were observed upon knock-down RPS24, which belongs to i-RPSs like RPS5 and RPS6 (not shown).

These data indicate that the pre-rRNAs accumulating in residual PNBs upon depletion of pre-rRNA maturation factors correspond to the species whose maturation is affected.

Residual PNBs contain pre-ribosomal factors

Pre-rRNAs found in residual PNBs are likely to be part of pre-ribosomal particles. As mentioned above, electron microscopy showed that residual PNBs contained particles, which size was compatible with that of pre-ribosomes. To evaluate the degree of assembly of these particles, we localized pre-ribosomal proteins in residual PNBs with specific antibodies directed against Dim2, bystin/Enp1, Nob1, Ltv1 and Rio2. We did so after knockdown of several RPS proteins (i.e. RPS24, RPS19, RPS29) and bystin. Indeed, hDim2 and bystin, which are presumably part of early pre-ribosomes, were detected in residual PNBs upon depletion of RPS24 (Figure 6). In contrast,

hNob1, the putative endonuclease ensuring cleavage of the 18S rRNA 3' end in the cytoplasm, and the late pre-40S particle proteins hLtv1 and hRio2 were not localized in these structures. The presence of these proteins in residual PNBs was correlated with their presence in nucleoli: hDim2 and bystin were the only ones to be detected in nucleoli. These data suggest that the pre-ribosomes present in rPNBs contain early processing factors, but do not recruit late pre-ribosomal factors, which are presumably involved in nuclear export and final cytoplasmic processing. Consistent with this idea, the U3 snoRNA, which is part of the SSU processome, was visualized in residual PNBs (data not shown).

Resorption of PNBs at the end of mitosis is correlated with resumption of pre-rRNA processing

The data described above showed that accumulation of residual PNBs is correlated to pre-rRNA processing defects. This suggests a model along which resorption of PNBs would be coupled to pre-rRNA processing. If this were true, one would expect to observe pre-rRNA maturation taking place in PNBs at the end of mitosis. To test this hypothesis, we detected pre-rRNAs by FISH in mitotic HeLa cells grown under normal conditions. Several probes complementary to the various transcribed spacers were used to precisely determine the maturation degree of the pre-rRNAs in cells during mitosis and early G1 (Figures 7A and 7B).

Pre-rRNAs were detected in nucleoli until prometaphase, at which time this structure disappeared and pre-rRNAs formed a layer (sheath) around condensed chromosomes (Figure 7B). In addition, small bodies containing pre-rRNAs appeared in the cytosol at metaphase, presumably corresponding to NDFs. This distribution of pre-rRNAs was observed until telophase, when chromosomes started to decondense. At this stage, the perichromosomal sheath containing the pre-rRNAs began to break down and agglomerated into PNBs within interchromosomal spaces. Cytosolic spots were detected until the telophase/G1 phase transition, whereas PNBs were still observed in early G1 cells.

As shown in Figure 7A, the nature of the pre-rRNAs found in PNBs changed along progression of mitosis. Probes complementary to the 5'-ETS, the ITS1 or the ITS2 labeled both the NDFs and the chromosomal sheath from prometaphase to telophase, indicating the presence of early precursors in these structures. It should be noted however that some NDFs labeled with the ITS1 probe were not recognized by the 5'-ETS probe, strongly suggesting that they contained partially processed precursors. PNBs forming in telophase were also labeled with the same probes. However, the proportion of PNBs labeled with 5'-ETS probes in telophase was lower than those labeled with ITS1 and ITS2 probes. This difference became more strongly marked at the transition between telophase and G1 phase, whereas PNBs in early G1 cells were detected with the ITS1 and ITS2 probes, but not the 5'-ETS probes. The disappearance of early transcripts detected with the 5'-ETS probes correlated with that of fibrillarin, which was present in PNBs until early G1. Finally, the most stable PNBs in G1 cells were detected with the ITS2 probe, and not the ITS1 probe, indicating that the latest PNBs only contained 60S subunit precursors.

DISCUSSION

The nucleolus is a nuclear compartment whose major function consists of ribosome biogenesis. Transcription of rDNA, pre-rRNA processing and assembly with the ribosomal proteins take place in this compartment. The nucleolus is composed of three structural sub-domains, the fibrillar center, the dense fibrillar component and the granular component, easily distinguishable by electron microscopy (Hadjilov, 1985, Thiry et al., 2000). During the cell cycle, nucleoli disassemble at the start of the mitosis, after chromosome condensation. Nucleoli begin to reassemble during telophase around the nucleolar organizer regions (NORs), simultaneous to the reformation of nuclear envelope. Because of this nucleolar deconstruction, machineries of synthesis and processing of the rRNA are inactivated at the end of the prophase and some of these components relocated to the cytosol. rDNA transcription and pre-ribosomal particles maturation are progressively reactivated during telophase.

The transcription of rDNA by the RNA polymerase I is inhibited by phosphorylations of its co-factors by the complex CDK1/cyclinB (Heix et al., 1998, Sirri et al., 1999). The activity of this complex CDK1/cyclinB is required for transcription inhibition from prophase to telophase (Sirri et al., 2000). During this period, several components of the transcription machinery, as UBF and some subunits of RNA polymerase I, are still associated to the NORs as inactivated complexes whereas others components relocated to the nucleoplasm or to the cytosol, such as the three subunits of the RNA pol I, RPA16, RPA39 and RPA194 (Zatsepina et al., 1993, Roussel et al., 1996, Sirri et al., 1999, Leung et al., 2004, Chen et al., 2005). Pre-rRNA maturation is inhibited from prophase to telophase, but the mechanisms by which this process is silenced remain largely unknown. A parsimonious hypothesis would be that they involve the same regulatory factors as for the arrest of the rDNA transcription machinery. Hence, CDK1 was shown to play a major role in the inhibition of RNA polymerase I activity. Pharmacological inhibition of CDK1 activity during mitosis has shown the release of RNA polymerase I transcription (Dousset et al., 2000, Sirri et al., 2000). However, the neo-synthesized pre-rRNAs were not processed under these conditions, and it

was not clear as to whether mitotic pre-rRNAs were processed or degraded.

However, location of pre-ribosomal factors during mitosis varies and depends on the activity of CDK1/cyclinB. Indeed, from prometaphase to anaphase, pre-ribosomal factors have various locations: they either diffuse in the cytosol, or concentrate around the condensed chromosomes to form a perichromosomal sheath (Azum-Gelade et al., 1994, Gautier et al., 1994, Leung et al., 2004). From telophase, pre-ribosomal factors concentrate into cytosolic or nucleoplasmic dots, respectively called nucleolar derived foci (NDFs) and pre-nucleolar bodies (PNBs). The PNBs generally contain pre-ribosomal factors and some pre-rRNAs, but not components from the RNA polymerase I (Ochs et al., 1985, Chan et al., 1991, Roussel et al., 1993, Jimenez-Garcia et al., 1994, Dundr and Olson, 1998, Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999, Savino et al., 1999, Dundr et al., 2000, Leung et al., 2004, Thiry et al., 2009). They are composed of nucleolar proteins from the DFC and the GC, such as fibrillarin, Nop52, B23 and nucleolin, and of the snoRNA U3 and 14. It has been shown that the composition of PNBs varies, as different types PNBs co-exist within the same cell. Indeed, some PNBs are composed of nucleolar proteins implicated in the earliest stage of ribosome biogenesis, while other PNBs contain pre-ribosomal factors requires for later steps of pre-rRNA processing (Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999, Savino et al., 1999).

The PNBs are observable in the nucleoplasm of the daughter cells from telophase until G1. They are progressively resorbed during G1 phase. Disappearance of these nucleoplasmic spots seems to be a passive process of proteins diffusion from these structures to the newly-reformed nucleoli. However, even if this process is not an active one, recruitment of nucleolar proteins from PNBs to nucleoli is done in an orderly manner. Proteins required for the first steps of ribosome biogenesis are the first to be recruited, such as fibrillarin, whereas pre-ribosomal factors implicated in further steps come back to the newly-reformed nucleoli at a later stage (Savino et al., 1999, Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001, Leung et al., 2004). Quantitative analyses of the disappearance of the nucleolar proteins from PNBs have led to a model for the recruitment order of the nucleolar protein from PNBs to neo-nucleoli. First, proteins that relocalized to nucleoli are proteins belonging to the DFC, followed by proteins from the GC (Leung et al., 2004, Angelier et al., 2005).

However, partially processed pre-rRNAs were still detected in the course of mitosis. Dundr and Olson claimed that only the earliest precursors of the 18S rRNA were found in monkey CMT3 cells during mitosis (Dundr and Olson, 1998). In the present study, we evidenced several kinds of pre-rRNAs in mitotic HeLa cells. Similar observations were previously reported by the group of Hernandez-Verdun in HeLa cells (Dousset et al., 2000). This discrepancy may be due to differences in the order of pre-rRNA cleavages between these two cell types.

The present study, which tackled the question of the fate of unprocessed pre-rRNAs during mitosis by using a broad range of FISH probes, demonstrated that these unprocessed pre-rRNAs were in fact conserved throughout mitosis. In addition, our results on control mitotic cells describe in details the order of disappearance of the different pre-rRNA species when rRNA processing resumes. Indeed, PNBs assemble at telophase from the chromosomal sheath and from cytosolic material. At the same time, the 5' ETS leader was detected in nucleoli, indicating resumption of transcription. Pre-rRNA maturation resumed in PNBs, which led to the progressive disappearance of the 5'-ETS from these structures. While detected in PNBs right after they form in telophase, the proportion of PNBs containing 5'-ETS decreased rapidly in early G1 cells to reach zero in PNBs observed in G1 cells. In contrast, probes complementary to ITS1 and ITS2 labeled late PNBs in G1, indicating the presence of 18S and 28S processing intermediates lacking the 5'-ETS. The latest PNBs observed were only labeled with the ITS2 probes. Consistent with the presence of the sole pre-60S particles in these PNBs, Dundr et al. (2000) found that late PNBs in mouse CMT3 cells were labeled with a probe complementary to the 28S rRNA, but did not contain 18S rRNA precursors. The stronger persistence of 60S subunit precursors in PNBs is correlated with the longer maturation time of these subunits compared to the 40S subunits. Thus, the early disappearance of the 5'-ETS from PNBs, the presence of intermediate precursors of both subunits at the telophase/G1 phase transition, and the late presence of pre-60S particles in the latest PNBs fully supports the hypothesis of progressive maturation of pre-ribosomal particles in PNBs during mitosis.

These data are further reinforced by our observation that alteration of pre-rRNA processing of

several ribosomal proteins of the small or large subunits or pre-ribosomal factors induced residual nucleoplasmic dots containing pre-rRNAs in 30 to 60% of the cells. We identified these nucleoplasmic foci as pre-nucleolar bodies, which did not disappear after the end of mitosis and were observable for more than 7 h after the beginning of anaphase. Pre-rRNAs composition of these residual PNBs (rPNBs) was dependant on the maturation defects induced by depletion of each ribosomal protein. Moreover, the presence in these rPNBs of pre-rRNAs and early pre-ribosomal factors suggests that these structures contain pre-ribosomal particles blocked in their maturation, and that a normal processing pathway is required for the proper recruitment of the nucleolar proteins from PNBs to new nucleoli. This model is supported by the fact that in control cells, prerRNAs composition of PNBs evolves from telophase to the early G1 phase, the earliest pre-rRNAs being the first which disappear, followed by later precursors.

Till now, the relationship between pre-rRNA processing and PNBs has remained a matter of debate. As mentioned above, one of the most striking observations on nucleolar reassembly is that the order of disappearance of processing factors from PNBs is correlated to their order of action in pre-rRNA processing (Savino et al., 1999, Savino et al., 2001). It was proposed that pre-rRNAs were assembly platforms for complexes of processing factors before incorporation into the nucleolus (Dousset et al., 2000, Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001, Angelier et al., 2005). According to this hypothesis, retention of nucleolar proteins in PNBs would be regulated by differentially stable pre-rRNAs. However, the driving force behind the differential stability of the pre-rRNAs has remained vague. It has been proposed that repression of CDK1 at the end of mitosis lead to degradation or processing of mitotic pre-rRNAs (Dundr et al., 2000, Sirri et al., 2000, Savino et al., 2001). Here, by observing PNBs persisting in G1 phase in pre-rRNA processing-deficient cells, we provide evidence that pre-rRNAs in PNBs undergo maturation, which is likely to dictate the ordered release of processing factors from PNBs and drive the progressive disappearance of PNBs in G1 phase.

In conclusion, this led us to re-evaluate the model that had been proposed previously for the role of PNBs (Angelier et al., 2005) (Figure 8). From our results, we hypothesized that PNBs are sites in

which pre-rRNA maturation resumes, concomitantly with newly-reformed nucleoli (Figure 8A). To begin with, the most immature pre-rRNA species are detected in PNBs, along with early processing factors. As these species progressively mature, these early factors are released from PNBs and can be recruited to the newly-reformed nucleoli. As pre-rRNA processing progresses in PNBs, intermediate and then late processing factors are then progressively released. This leads to a rapid disappearance of PNBs as the cells progresses in G1 phase. When an RPS or a pre-ribosomal factor is depleted (Figure 8B), pre-rRNA maturation occurs in PNBs until it reaches the specific step at which the missing protein is required. Residual PNBs, whose content directed depends on the nature of the missing protein, accumulate for several hours in the nucleoplasm and cells are delayed or arrested in G1 phase. This model accounts for the situation observed in Diamond Blackfan anemia, a rare congenital disease in which haploinsufficiency of some ribosomal proteins has been described (Gazda et al., 2006). The link established between impaired cell progression and the depletion of an increasing number of ribosomal proteins or a ribosomal factor such as bystin will need further studies to understand whether this process is controlled by the p53 pathway, as previously shown for RPL5, RPL11 and RPL23 (Zhang et al., 2006).

FUNDINGS

This project was supported by the CNRS, the University of Toulouse, the French National Research Agency (ANR – RIBEUC project) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (grant 1058 to P.E.G.). P.E.G. is a fellow of the Institut Universitaire de France. C.C. received a doctoral grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche, and from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Drs. Ulrike Kutay for the gift of antisera and cell lines, Danièle Hernandez-Verdun and Pascal Roussel for the HeLa-B23 cell line and plasmid constructs, Céline Verheggen and Jérôme Cavallé for snoRNA probes, and Christophe Normand for his help with the spinning disk confocal microscope. The modified oligonucleotide snoRNA probes for RNA FISH were kindly synthesized by J.M. Escudier at ITAV (Plateforme de synthèse de l'Interface Chimie Biologie). The authors also wish to thank Dr. Céline Verheggen for her early interest in the project and helpful advice, Drs. Jérôme Cavallé, Franck Delavoie, Guillaume Stahl, Célia Plisson-Chastang and Milena Preti for scientific discussions.

AUTHOR CONTRIBUTION

Coralie Carron designed and performed most of the experiments, Marie-Françoise O'Donohue and Marlène Faubladié performed part of the experiments. Stephanie Balor and Coralie Carron set up the CLEM procedure and performed the observations. Pierre-Emmanuel Gleizes supervised the project. Coralie Carron, Marie-Françoise O'Donohue and Pierre-Emmanuel Gleizes were involved in the writing of the manuscript.

REFERENCES

- Angelier N, Tramier M, Louvet E, et al. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16:2862-2871.
- Azum-Gelade MC, Noaillac-Depeyre J, Caizergues-Ferrer M, Gas N. Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. *J Cell Sci* 1994; 107:463-475.
- Carron C, O'Donohue MF, Choismel V, Faubladiere M, Gleizes PE. Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* 2010;
- Chan EK, Imai H, Hamel JC, Tan EM. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med* 1991; 174:1239-1244.
- Chen D, Dunder M, Wang C, et al. Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J Cell Biol* 2005; 168:41-54.
- Choismel V, Bacqueville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2007; 109:1275-1283.
- Choismel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1253-1263.
- Dousset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D, Huang S. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell* 2000; 11:2705-2717.
- Dunder M, Misteli T, Olson MO. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 2000; 150:433-446.
- Dunder M, Olson MO. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell* 1998; 9:2407-2422.

- Eichler DC, Craig N. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1994; 49:197-239.
- Fatica A, Tollervey D. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:313-318.
- Fomproix N, Hernandez-Verdun D. Effects of anti-PM-Scl 100 (Rrp6p exonuclease) antibodies on prenucleolar body dynamics at the end of mitosis. *Exp Cell Res* 1999; 251:452-464.
- Gautier T, Fomproix N, Masson C, Azum-Gelade MC, Gas N, Hernandez-Verdun D. Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol Cell* 1994; 82:81-93.
- Gazda HT, Sieff CA. Recent insights into the pathogenesis of Diamond-Blackfan anaemia. *Am J Hum Genet* 2008; 83:769-780.
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *Br J Haematol* 2006; 135: 149-57.
- Hadjiolov, A. A. (1985). *The nucleolus and ribosome biogenesis* (Wien: Springer-Verlag).
- Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* 1998; 17:7373-7381.
- Jimenez-Garcia LF, Segura-Valdez ML, Ochs RL, Rothblum LI, Hannan R, Spector DL. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 1994; 5:955-966.
- Kressler D, Hurt E, Bassler J. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803:673-683.
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, et al. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* 2004; 166:787-800.
- Louvet E, Junera HR, Le Panse S, Hernandez-Verdun D. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp Cell Res* 2005; 304:457-470.

- O'Donohue MF, Choismel V, Faubladiet M, Fichant G, Gleizes PE. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol* 2010; 190:853-866.
- Ochs RL, Lischwe MA, Shen E, Carroll RE, Busch H. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 1985; 92:330-336.
- Robledo S, Idol R, Crimmins D, Ladenson J, Mason P, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 2008; 13.
- Rouquette J, Choismel V, Gleizes PE. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J* 2005; 24:2862-2872.
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 1996; 133:235-246.
- Roussel P, Andre C, Masson C, Geraud G, Hernandez-Verdun D. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 1993; 104:327-337.
- Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:2415-2420.
- Savino TM, Bastos R, Jansen E, Hernandez-Verdun D. The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J Cell Sci* 1999; 112:1889-1900.
- Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 2001; 153:1097-1110.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci* 1999; 112:3259-3268.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 2000; 148:259-270.

- Thiry M, Cheutin T, Lamaye F, et al. Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis. *Histochem Cell Biol* 2009; 132:129-140.
- Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D. Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* 2000; 6:1750-1761.
- van Rijnsoever C, Oorschot V, Klumperman J. Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat Methods* 2008; 5:973-980.
- Zatsepina OV, Voit R, Grummt I, Spring H, Semenov MV, Trendelenburg MF. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma* 1993; 102:599-611.
- Zemp I, Wild T, O'donohue M, et al. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *The Journal of Cell Biology* 2009; 185:1167-1180.
- Zhang F, Hamanaka RB, Bobrovnikova-Marjon E, Gordan JD, Dai MS, Lu H, Simon MC. Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest.. *J Biol Chem* 2006; 281: 30036-45.

FIGURE LEGENDS**Figure 1: Pre-rRNA processing in HeLa cells**

A schematic view of rRNA processing pathways in Human is displayed. The mature rRNA species (18S, 5.8S and 28S) are schematized by gray rectangles, positioned along the full 47S transcript. Maturation proceeds through multiple cleavages whose position is represented by arrowheads. They affect either the 2 external transcribed spacers (ETS1 and ETS2) flanking the 18S and the 28S rRNA, or the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). Two alternative pathways are presented, according to the kinetics of the ETS1/5'-ETS or ITS1 maturation. As the cleavage at site 2 in the ITS1 is favored, pathway B is predominant in control human cells.

Figure 2: Characterization of the residual nuclear foci observed in HeLa-B23 cells depleted of RPS19 or RPS24.

(A) HeLa cells, stably expressing GFP-B23, were treated for 48 h with siRNAs targeting RPS19 or RPS24, or with a scramble siRNA. After fixation and permeabilization, they were hybridized with a 5'ITS1 probe labeled with Cy5 and nuclei were counter stained with Hoechst 33342. The nucleoplasmic foci present in siRNA *rps19* or *rps24*-treated cells contained both B23 and the precursors of the 18S rRNA. For a better visualization of the lowest values of gray levels, the gamma value was set to 2. The bar is 5 μm . (B) Time-lapse (3D + time) microscopy was carried out with a confocal microscope equipped with a spinning disk. HeLa-B23 cells treated for 48 h with a scramble siRNA (control cell) or with a mixture of siRNAs *bystin-1* and *bystin-2* (treated cell) were imaged from anaphase/early telophase to progression into G1 phase. In order to minimize cell photo-bleaching, the stacks were acquired with a 0.3 μm z-step every 10 min for 1 h, and then every 30 min for up to 7 h. The galleries present a maximal intensity projection of each z-stack with an inverted contrast. The bar is 5 μm .

Figure 3: Identification and morphological analysis of residual PNBs in HeLa-B23 cells by correlative light electron microscopy.

HeLa-B23 cells were submitted either to a scramble siRNA or to siRNA *rps24* or a mixture of *bystin1* and *bystin-2*. Ultrathin sections laid on alphanumerical grids were first screened by fluorescence microscopy in order to localize cells containing PNBs. The grids were then observed at 80 kV with a transmission electron microscope and images were captured with an AMT digital camera. The sets of images obtained by both techniques were rescaled and superimposed by using Photoshop software. Column 1 (from left): fluorescence microscopy imaging of PNB-containing cells; column 2: TEM images of the same cells; column 3: superimposition of both images; column 4: enlarged views of the PNBs pointed with red arrow heads. The bar is 2.5 μm for the images of the first three columns, and 250 nm for the enlarged views displayed in column 4.

Figure 4: Cell-cycle progression is strongly affected in HeLa cells depleted of ribosomal protein RPS19.

Multi-parameter image cytometry was carried out to assess cell cycle progression in cells that contain residual PNBs compared to control cells. Two days after transfection with a *scramble* siRNA or siRNA *rps19*, EdU was added to the cell medium for 4 or 6 h in order to estimate the percentage of cells that progressed through S phase. This analogue of thymidine was revealed by click reaction with an Alexa594-azide in the presence of copper sulfate. The residual PNBs were then revealed by FISH with a 5'ITS1-Alexa488 probe and the nuclei were counter stained with Hoechst 33342. Images corresponding to adjacent fields were acquired systematically along the slide at 3 different wavelengths until 500 to 1000 nuclei were collected. Nuclei, mitotic cells and PNB-containing cells were then counted and assessed for the presence of EdU labeling in their nucleus. The histogram represents the percentage of each cellular subtype compared to the total number of nuclei (in turquoise blue and ochre, respectively for control and siRNA *rps19*-treated cells), onto which the proportion of EdU-containing cells has been superimposed (in cyan and brown, respectively for control and siRNA *rps19*-treated cells).

Figure 5: Differential analyses of dual-probe FISH experiments allow identification of pre-rRNA species within residual PNBs.

HeLa cells subjected for 48 h to siRNAs *rps5*, *rps19*, *rps29*, *rpl5*, a mixture of *bystin-1* and *bystin-2* or a scramble siRNA (control) were fixed, permeabilized and then hybridized with two probes labeled with different fluorophores. The pre-rRNA content analyzed by Northern blot and revealed with the same probe was shown on the side of each image, and its corresponding schematic representation with the position of each probe was displayed. As the fluorescence intensity of PNBs was low compared to the nucleolar labeling, images were subjected first to a top-hat filter (with a circular region, 3.9 μm in diameter), and then to a (3 X 3 X 1) median filter. After a background subtraction performed in similar conditions for all the images, the gray level dynamics was flattened by binarization. This procedure allowed a clear identification of PNBs versus nucleoli without losing information. When the residual PNBs were only labeled by one of the two probes, the differential analysis of the two pre-rRNA profiles allowed us to reduce the content of the PNBs up to one or two different species. The PNB content depends upon the nature of the depleted protein, as the precursors of the 5.8S and the 28S were identified in the absence of RPL5 while the 18S RNA precursors accumulated in the absence of RPS or bystin. (A) 5'ITS1-Cy3 (red), ITS2-Cy5 (green), and merged images (yellow). (B) 5'ITS1-Cy3 (red), ETS1-1399-Cy5 (green), and merged images (yellow). The nuclear periphery was represented in blue. The bar is 5 μm .

Figure 6: PNBs contain additional pre-ribosomal factors.

In order to assess the protein content of PNBs, several antisera directed against pre-ribosomal factors were used in HeLa-B23 cells treated for 48 h with siRNA *rps24*. In order to better visualize potentially co-localized labelings, the images were deconvoluted with the nearest neighbor algorithm and displayed with a gamma value of 1.5. The nuclear periphery was represented in blue. The bar is 5 μm .

Figure 7: PNB content in pre-rRNA species is modified in the course of mitosis and during progression in G1 phase.

The nature of the pre-rRNAs contained in NDFs and PNBs was assessed in control HeLa-B23 cells during mitosis and early G1 by dual-probe FISH experiments, as described in the legend of Figure 5. For each NDF- or PNB-containing cell, the total number of PNBs labeled with GFP-B23 was counted, and then the number of PNBs labeled by each probe was determined. Percentages of pre-rRNA positive PNBs were obtained for each probe and in each cell. A minimum of 13 mitotic cells, 14-19 cells in early G1 and 10-19 cells in G1 were studied for each experimental condition. The probe combinations were 5'ITS1-Cy3/ETS1-1399-Cy5 or 5'ITS1-Cy3/ITS2-Cy5. (A) Evolution of pre-rRNA content of NDFs and PNBs during mitosis and G1. The diagram shows a quicker disappearance of ETS1-containing pre-RNAs than ITS1- and then ITS2-containing pre-RNAs. (B) Gallery of typical images used in this study. Red arrow heads point NDFs or PNBs labeled by 2 probes, and green arrow heads give examples of PNBs labeled by a single probe. To allow a better visualization of NDFs and PNBs, the gamma value was set at 2 and the contrast was inverted. The bar represents 10 μ m.

Figure 8: A schematic model of PNB disappearance through pre-rRNA processing at the end of mitosis

(A) In control cells, the pre-rRNAs and proteins of the processing machinery concentrate in PNBs where the maturation is reactivated. As early processing occurs, the earliest pre-ribosomal factors (in green) are released and relocate to the reformed nucleoli. Factors involved in later process (in red and purple) are still present in PNBs. After acting in pre-rRNA processing, they progressively relocate to the nucleoli. Last pre-ribosomal particles, containing 18S-E, is then be exported to the cytoplasm, where its final maturation steps take place. (B) Upon induction of a ribosomal processing defect, for example an intermediate defect such that obtained after bystin or RPS19 depletion, early processing can still take place and the early pre-ribosomal factors (in green) can

relocate to the nucleoli. Since ITS1 maturation is drastically diminished, pre-ribosomal factors involved at this step or in further processing events are blocked in residual PNBs, and cannot relocate to the nucleoli. This strongly impairs G1 progression.

Supplementary Figure S1: Residual nucleoplasmic foci are observed upon depletion of several other RPS

Thirteen different RPS, whose knock down induced the accumulation of nucleoplasmic foci, have been identified in the present study: RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS11, RPS13 and RPS24 for early players of pre-rRNA processing (initiation RPSs or i-RPSs) (A); RPS18, RPS19, RPS20, RPS27a and RPS29 for intermediate and late players of pre-rRNA processing (progression RPSs or p-RPSs) (B). These foci were labeled by FISH with a 5'ITS1-Cy3 probe. The gamma value of the displayed images was set at 2 in order to allow a better visualization of the lowest gray level values. The bar is 5 μ m.

Supplementary Figure S2: Time-lapse experiments of HeLa-B23 cells during the end of mitosis and the start of G1 phase

The galleries show the maximal intensity projection of the stacks obtained by (3D + time) spinning disk confocal microscopy. The contrast was inverted. The cells were either transfected with a scramble siRNA (upper gallery) or a siRNA *rps19* (lower gallery). Z series were acquired every 3 min for 48 min, from anaphase or start of telophase till early G1 phase. The behavior of cells was identical in both cases, showing that the depletion of RPS19 had little effect at the end of mitosis and at the start of G1 phase. The bar is 5 μ m.

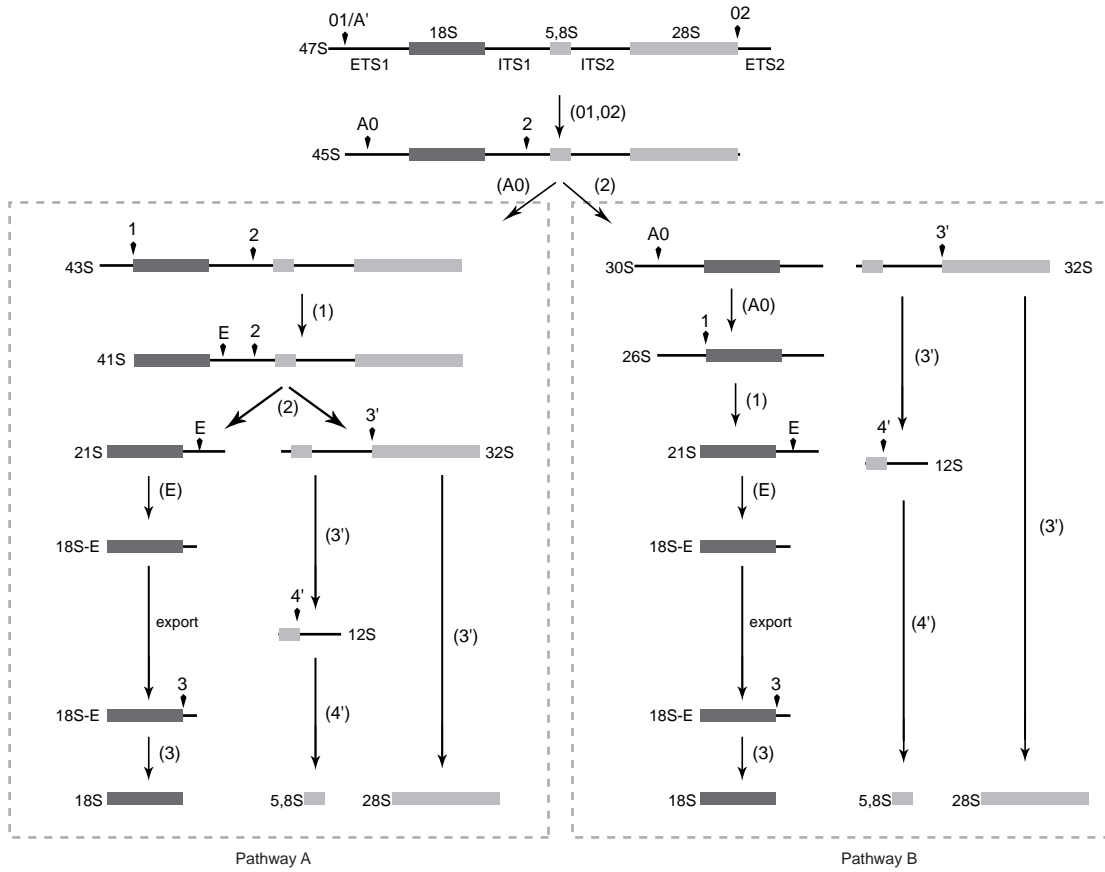
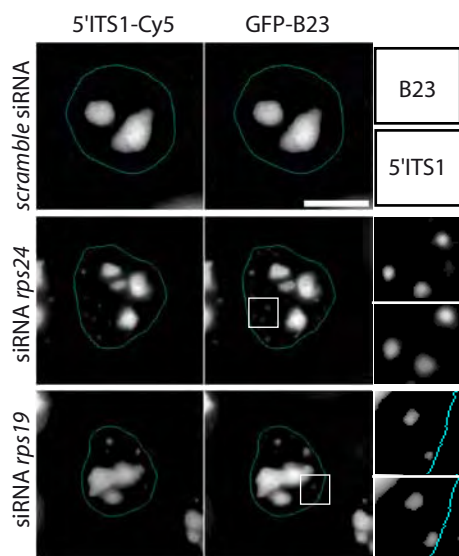
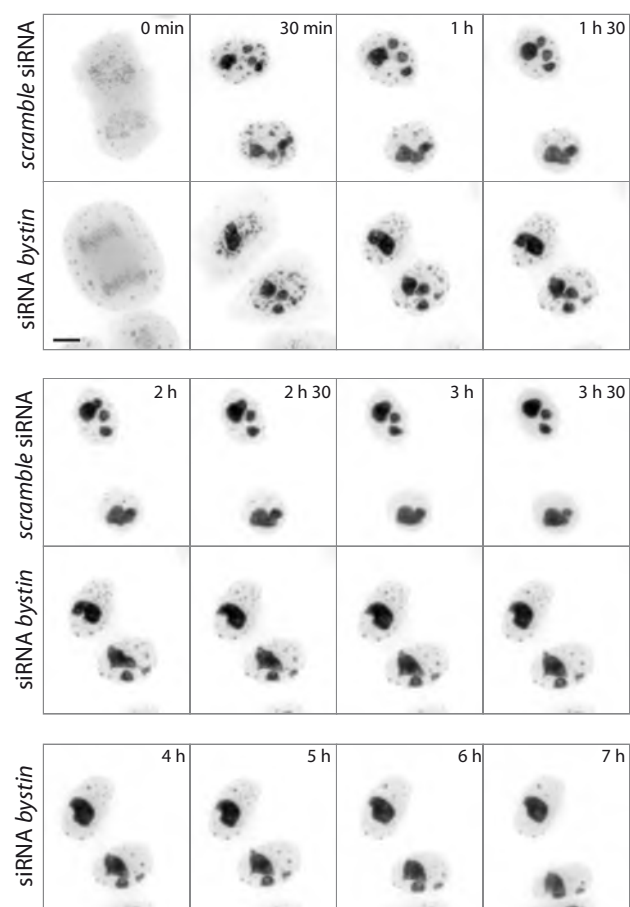


FIGURE 1

A**B****FIGURE 2**

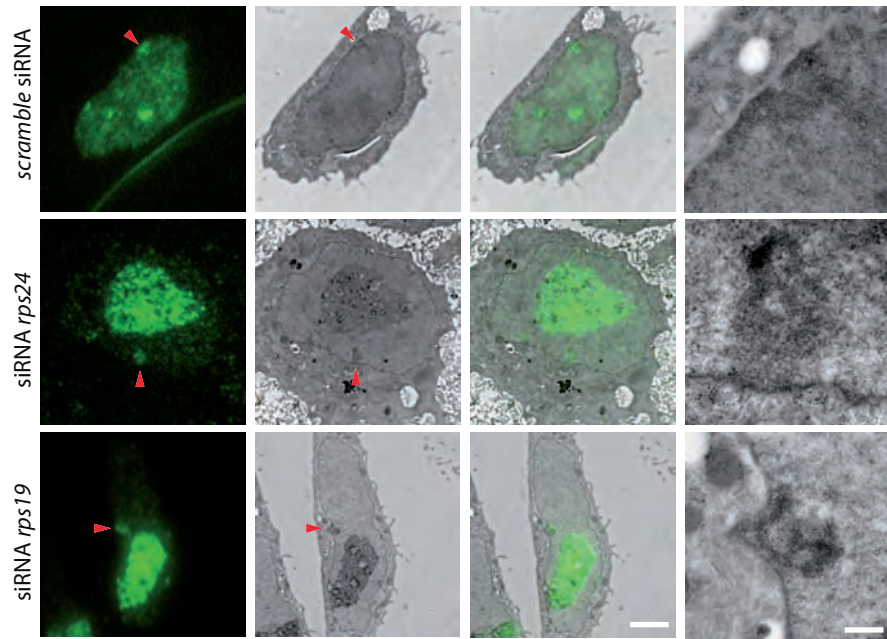


FIGURE 3

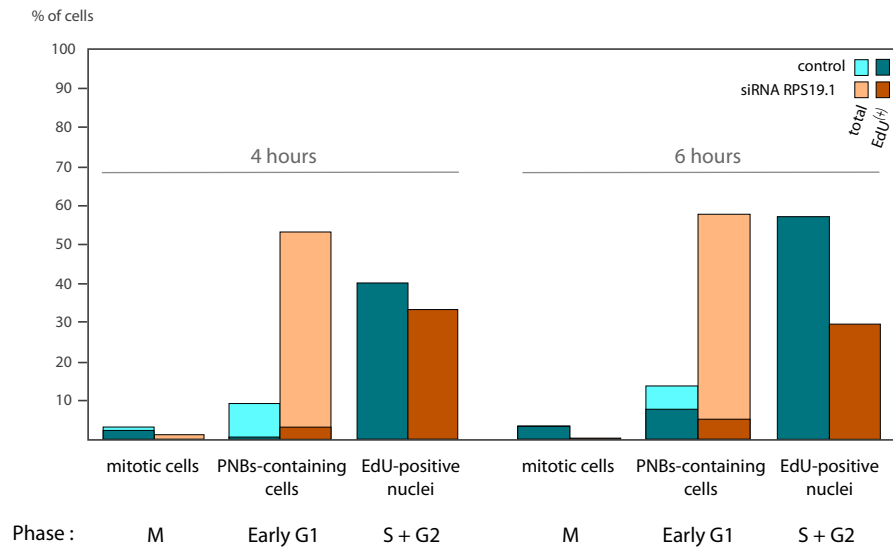


FIGURE 4

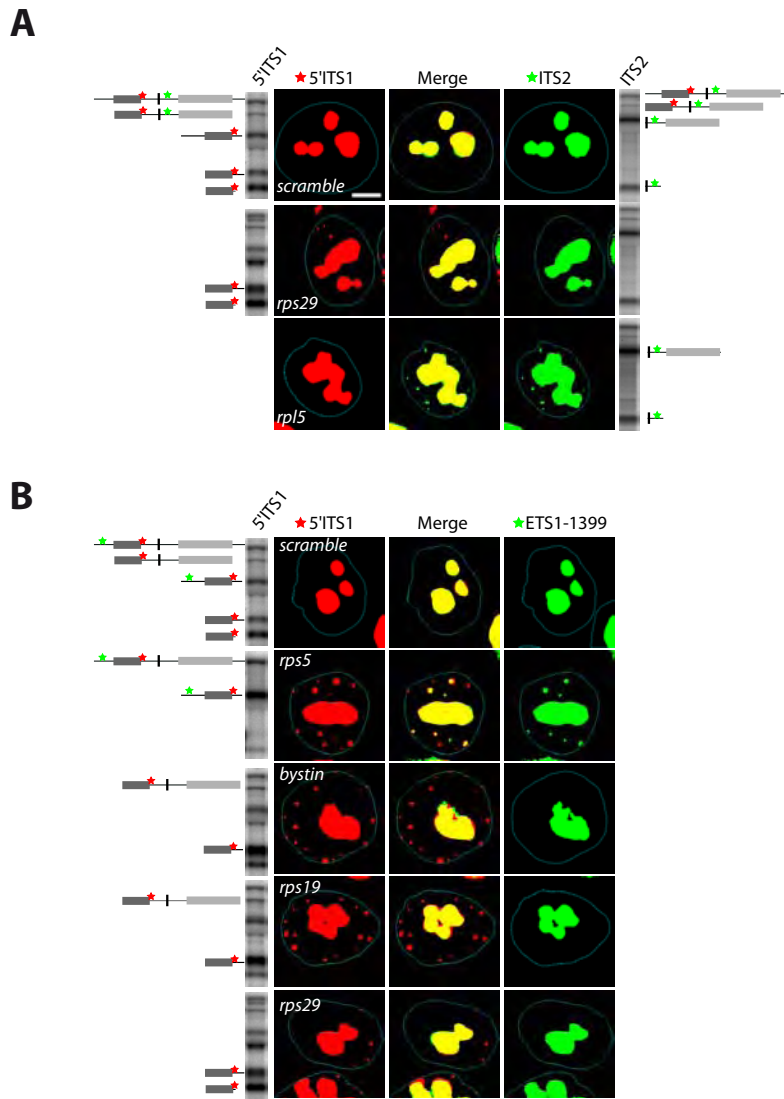


FIGURE 5

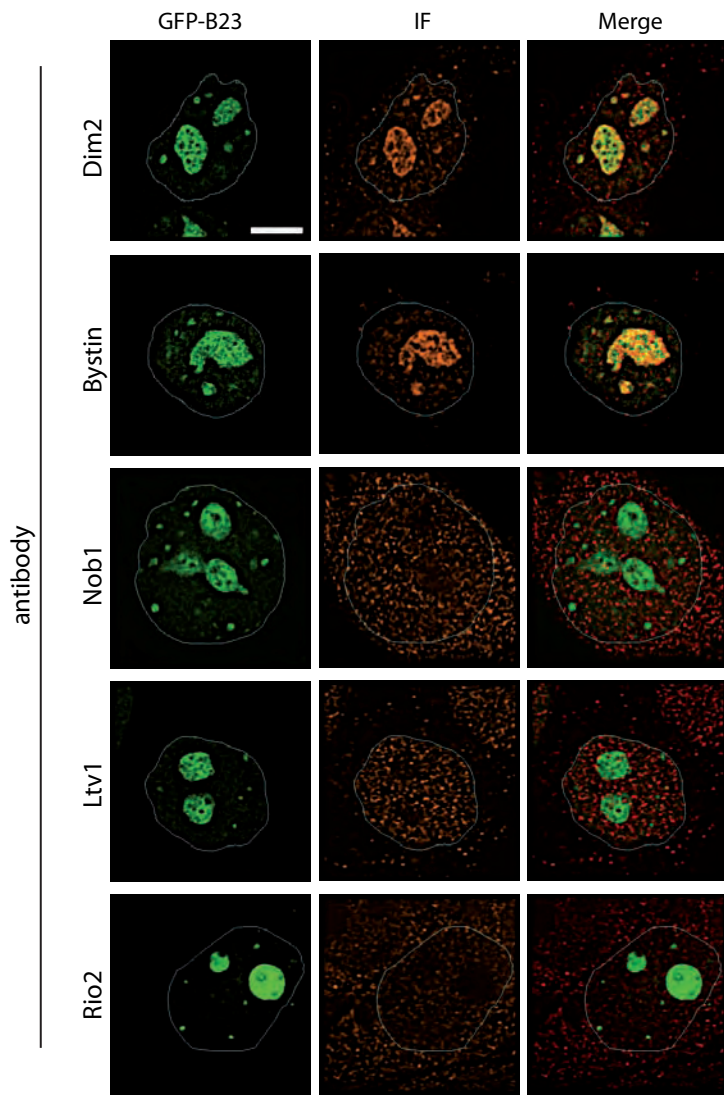
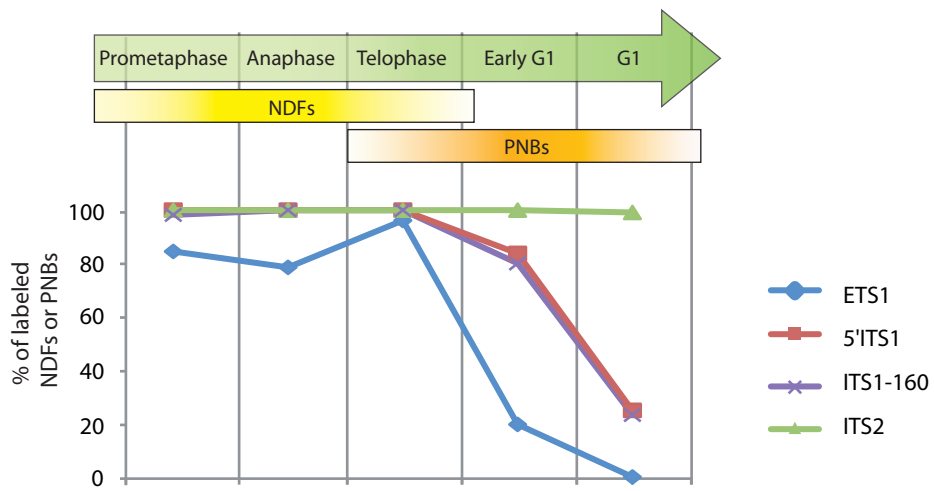
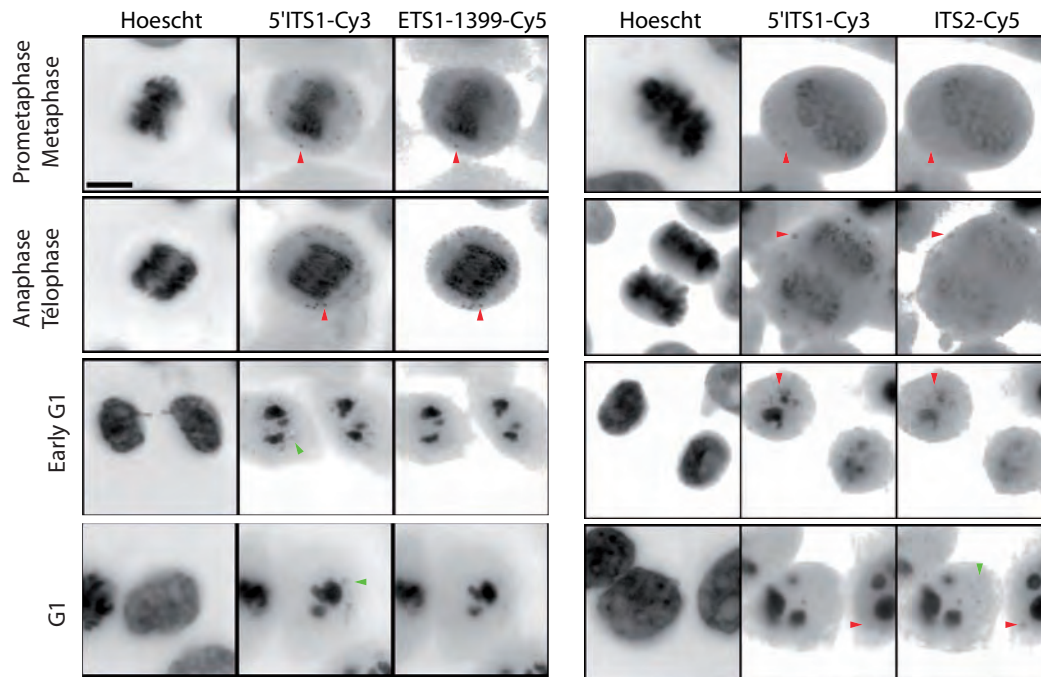
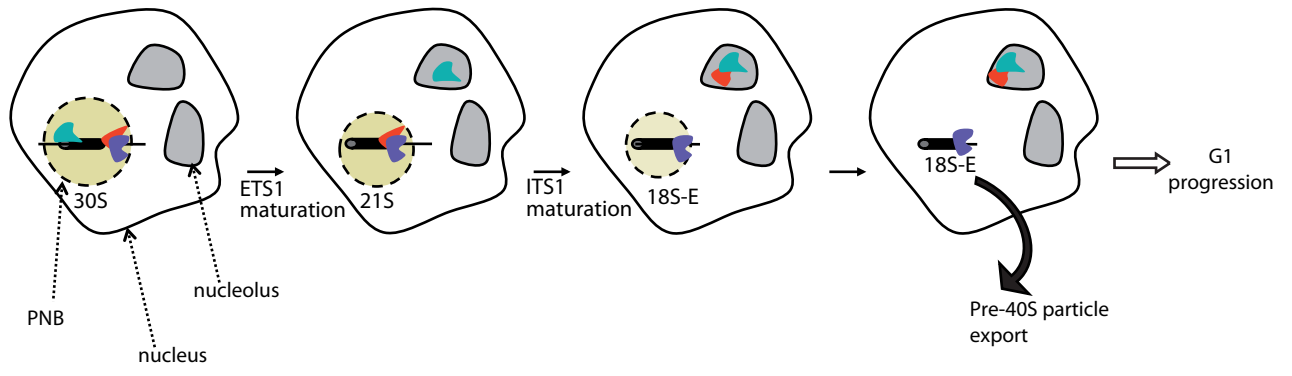
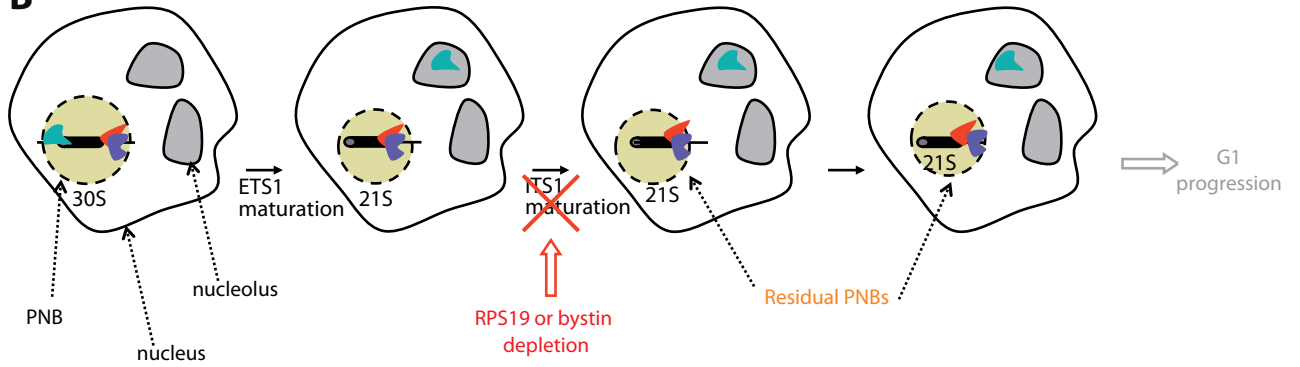


FIGURE 6

A**B****FIGURE 7**

A**B****FIGURE 8**

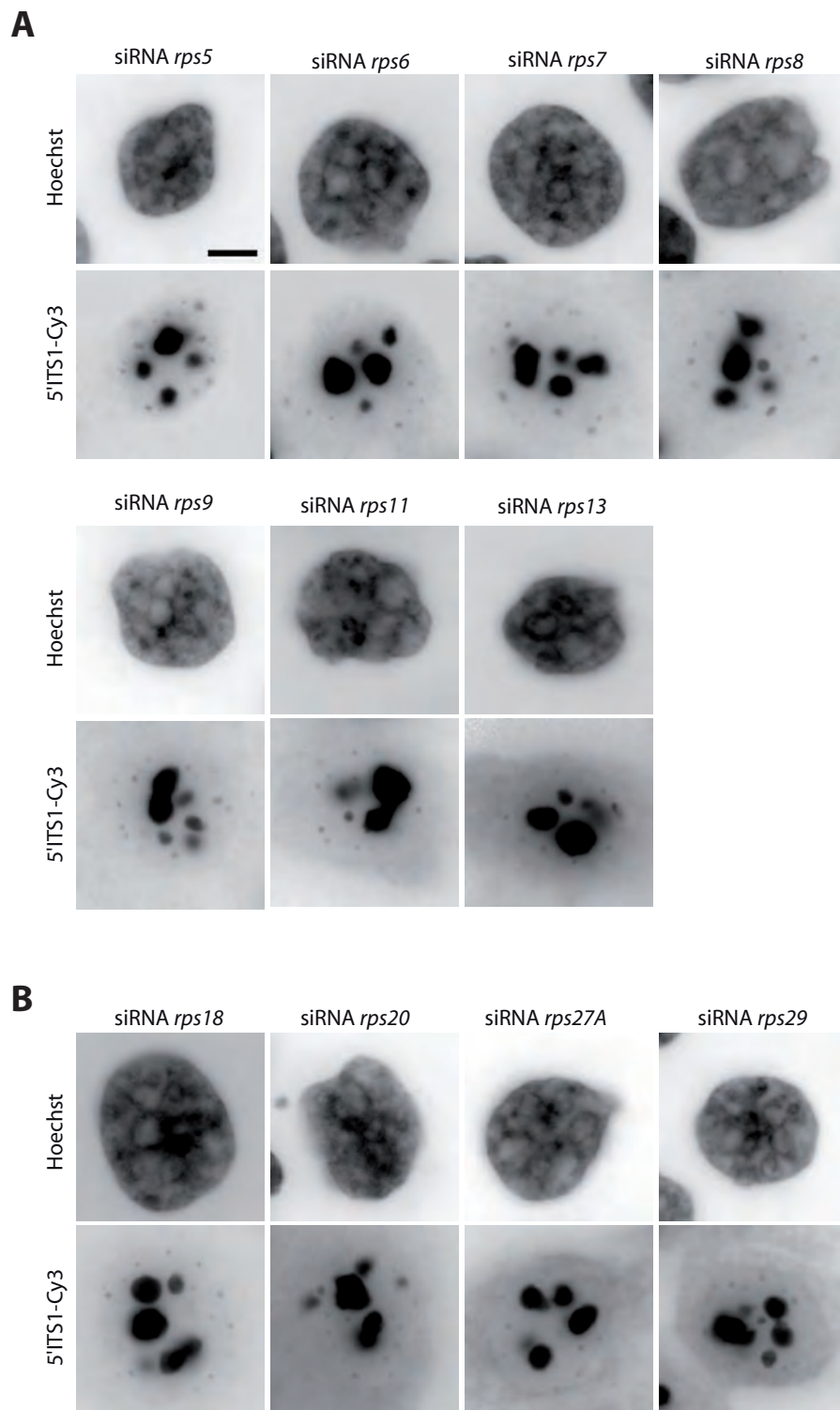


FIGURE S1

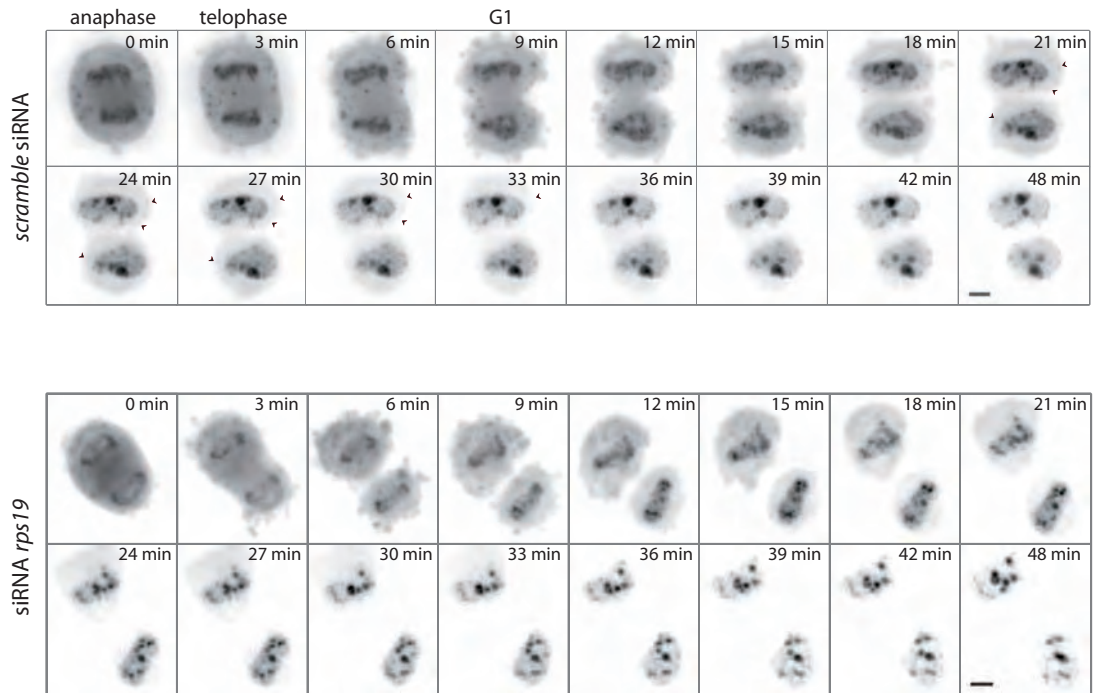


FIGURE S2

II – Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que la perte d'expression de protéines ribosomiques, qui entraîne un défaut de maturation des pré-ARNr, a également comme conséquence une persistance des PNBs dans le nucléoplasme des cellules sortant de mitose. De plus, la composition en acides nucléiques des PNBs est dépendante du défaut induit. Nous avons donc décrit pour la première fois un lien entre la reprise de la maturation des pré-ARNr et la résorption des PNBs en sortie de mitose.

En effet, cette hypothèse est soutenue par l'observation de la séquentialité de disparition des précurseurs des ARNr au sein des PNBs. Dans des cellules témoins, les précurseurs les plus précoces sont les premiers à disparaître des PNBs en fin de télophase tandis que les précurseurs tardifs sont observables jusqu'en G1. Cette observation est cohérente avec la description de la séquentialité de disparition des protéines nucléolaires impliquées dans la biogenèse des ribosomes.

Par ailleurs, cette étude a également mis en évidence la présence de précurseurs tardifs de l'ARNr 18S dans les PNBs. Des études précédentes avaient exclu la présence de tels pré-ARNr dans ces structures (Dundr *et al.*, 2000). Cependant, les cellules observées dans ce papier sont en phase G1 avancée. Comme nous l'avons décrit dans cette étude, les pré-ARNr présents le plus tardivement au sein des PNBs sont des précurseurs de la grande sous-unité. Ces PNBs tardifs sont également composés de la protéine B23. De fait, des cellules qui sont dans un stade avancé de la phase G1 peuvent présenter des PNBs observables avec la protéine B23 mais ne contenant pas de précurseurs nucléotidiques de la petite sous-unité. Nous avons donc montré que les PNBs étaient composés de tous les précurseurs des ARNr 18S, 28S et 5,8S mais que leur présence dans ces structures dépendait du stade de la mitose et de G1.

D'autre part, nous avons également observé au cours de cette étude que la composition en ARNr des PNBs à un même stade au sein d'une même cellule pouvait varier. En effet, lorsque l'expression de RPS19 est abolie par exemple, les pré-ARNr 21S, 21S-C et 41S s'accumulent dans la cellule. En FISH, l'utilisation de combinaisons de sondes s'hybridant à différents niveaux de l'ETS1, de l'ITS1 ou de l'ITS2 permet de discriminer entre les différentes espèces de pré-ARNr. Dans les cellules n'exprimant pas RPS19 nous pouvons observer des PNBs marqués avec les sondes 5'ITS1 et ITS2 et d'autres PNBs seulement marqués par la sonde 5'ITS1. Ce différentiel pourrait correspondre à des PNBs composés de pré-ARNr 41S et d'autres des pré-ARNr 21S, 21S-C et 18S-E. Il y aurait donc dans une même cellule et à un même stade des PNBs composés de particules ribosomiques précoces et d'autres composés de particules tardives.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de montrer la conservation de la fonction dans la biogenèse ribosomique de la bystine et de hTsr1 dans les cellules humaines. La caractérisation fonctionnelle de ces facteurs a par ailleurs mené à la description de nouvelles différences dans la maturation de l'ARNr 18S et dans le couplage export-maturation de la particule pré-40S chez les mammifères par rapport à la levure. Cependant, l'utilisation de la bystine et de hTsr1 comme outils pour l'analyse de la composition protéique des particules pré-40S s'est révélée compliquée et ne nous a pas donné de résultats satisfaisants quant à leur emploi comme appât, contrairement à ce que nous aurions envisagé initialement.

En outre, l'étude de la bystine a permis de mettre en évidence des défauts de résorption des corps pré-nucléolaires dans les cellules présentant des défauts de biogenèse des ribosomes. Ce phénotype avait été préalablement observé dans des cellules n'exprimant pas certaines protéines ribosomiques, de la petite ou de la grande sous-unité. Ces résultats m'ont conduit à m'intéresser plus en détails à ce phénotype et à identifier ces foci nucléoplasmiques comme des PNBs résiduels en phase G1. La persistance de ces PNBs semble par ailleurs liée à un arrêt du cycle cellulaire dans cette phase. Nous avons ainsi pu décrire pour la première fois un lien entre la reprise de la maturation des pré-ARNr et la résorption des PNBs en sortie de mitose, et proposer un modèle du mécanisme contrôlant la séquentialité de disparition des protéines nucléolaires au sein des PNBs.

A – Évolution de la biogenèse de la petite sous-unité

La maturation de l'ARNr 18S présente des étapes supplémentaires de clivages chez l'homme par rapport à la levure. Chez *S. cerevisiae*, la maturation de l'ITS1, suite à la scission de la particule 90S au site A₂, ne nécessite qu'une seule étape de clivage au sein du pré-ARNr 20S pour produire l'ARNr 18S mature. Chez l'homme, suite au clivage au site 2 dans l'ITS1, 2 étapes de maturations de cet espaceur sont nécessaires pour la production de l'ARNr 18S mature : les pré-ARNr 21S-C et 18S-E.

Toutefois, la composition protéique des particules pré-40S cytoplasmiques est identique entre ces 2 espèces (Zemp *et al.*, 2009), et les étapes cytoplasmiques de la maturation de la petite sous-unité ne paraissent pas varier entre homme et levure (Rouquette *et al.*, 2005). En effet chez l'homme, le précurseur exporté dans le cytoplasme, le pré-ARNr 18S-E, correspond au dernier précurseur de maturation de l'ARNr 18S, comme cela est le cas chez la levure, chez qui la maturation du pré-ARNr 20S produit l'ARNr 18S dans le cytoplasme (Fatica *et al.*, 2003; Rouquette *et al.*, 2005; Vanrobays *et al.*, 2003). De fait, il paraît probable que les dernières étapes de maturation soient équivalentes entre ces 2 organismes. Toutefois, les étapes supplémentaires de maturation dans le noyau laissent supposer que des protéines spécifiques aux mammifères pourraient intervenir dans ce processus. En effet, certains facteurs pré-ribosomiques ne présentent pas d'homologues chez la levure, comme la protéine nucléolaire B23. Il serait donc intéressant d'analyser, dans les cellules humaines, la composition des particules pré-40S nucléaires afin de pouvoir la comparer à celle des particules pré-40S nucléaires de levure.

En ce qui concerne bystine/ENP1, ce facteur joue des rôles sensiblement différents chez la levure et chez l'homme. En effet, chez *S. cerevisiae*, Enp1p est requise pour la maturation de l'ETS1 et de l'ITS1, alors que chez l'homme ce facteur intervient au niveau de l'efficacité du clivage au site 2 et pour la progression de la maturation de l'ITS1. Que ce soit chez l'homme ou chez la levure, l'élimination de l'ETS1 est essentielle pour que la maturation de l'ITS1 puisse avoir lieu après le clivage au site A₂/2. Chez l'homme, bystine/ENP1 n'est pas requise pour la maturation de l'ETS1 puisqu'aucune accumulation des pré-ARNr 45S, 30S ou 26S n'est observée en absence de ce facteur. La bystine semble donc nécessaire à un niveau légèrement plus tardif dans la biogenèse de la sous-unité 40S chez l'homme, ou avoir un rôle plus spécialisé dans la maturation de l'ITS1. D'autre part, la bystine ne complémente pas son orthologue de levure, Enp1p (Chen *et al.*, 2003). Ces 2 orthologues jouent donc des rôles spécifiques dans chaque organisme, bien que leur

pourcentage d'identité au niveau de leur séquence protéique soit de 36% et atteint 50% dans leur partie C-ter. Toutefois, l'étude de la capacité d'Enp1p à compléter la bystine dans des cellules humaines permettrait d'analyser si le niveau d'implication de ces 2 facteurs dans la maturation de l'ITS1 est équivalent chez l'homme et chez *S. cerevisiae*, et viendrait compléter les études réalisées dans notre laboratoire.

Enp1p joue un rôle essentiel dans la maturation de l'ETS1 chez *S. cerevisiae* et ce facteur est essentiel dans cet organisme. Dans les cellules humaines, un autre facteur pré-ribosomique semble intervenir dans les cellules humaines. Il serait donc intéressant de pouvoir découpler ces 2 rôles pour la protéine de levure, ce qui pourrait permettre la mise en évidence des domaines spécifiques pour chaque rôle de ce facteur. Cependant, par analyse bioinformatique, je n'ai trouvé aucune protéine humaine présentant une homologie spécifique de la séquence de la partie N-ter d'Enp1p. L'implication d'Enp1p dans la maturation de l'ETS1 ainsi que de l'ITS1 ne semble donc pas dépendre de domaines distincts de cette protéine. Nous pouvons donc supposer que bystine/Enp1 est essentielle pour que le pré-ARNr adopte une structure secondaire nécessaire afin que les clivages dans l'ETS1 et/ou dans l'ITS1 soient effectués. Or, la taille des espaceurs varie fortement entre levure et homme, passant d'environ 700 nt à 3700 nt pour l'ETS1, et de 360 nt à 1100 nt pour l'ITS1. De fait, le repliement de ces 2 espaceurs peut requérir une part plus importante d'énergie et/ou des facteurs spécifiques dans les cellules humaines. L'examen de la composition protéique des particules pré-ribosomiques humaines les plus précoces pourrait donc mettre en évidence de tels facteurs. L'analyse fonctionnelle de ces facteurs pourrait par la suite amener des données sur le type de protéines impliquées dans la maturation de l'ETS1 chez l'homme, et une étude de complémentation fonctionnelle de ces facteurs humains dans des cellules de levure n'exprimant pas Enp1p déterminerait quelle protéine peut compléter la fonction de Enp1p dans la maturation de l'ETS1 chez *S. cerevisiae*.

D'autre part, nos résultats ont montré un couplage différent entre maturation et export des particules pré-40S. En effet, le facteur Tsr1 est connu chez la levure pour son implication dans la maturation cytoplasmique du pré-ARNr 20S en ARNr 18S. Or chez l'homme, nous avons vu que hTsr1 est requise pour l'export nucléocytoplasmique des particules pré-40S. Sachant que la taille de l'ITS1 est de 360 nt chez *S. cerevisiae* et de 1100 nt chez l'homme (Figure 11), l'existence d'étapes supplémentaires dans la maturation de cet espaceur pourrait modifier la chronologie à laquelle interviennent certains facteurs pré-ribosomiques, comme hTsr1. Cependant, certains mécanismes de l'export sont conservés entre homme et levure, comme cela est le cas pour le rôle joué par RPS15 dans ce processus, ce qui laisse supposer une certaine conservation de cette étape (Leger-Silvestre *et al.*, 2004; Rouquette *et al.*, 2005). Chez la levure, Tsr1p est impliqué dans la maturation cytoplasmique du pré-ARNr 20S et s'associe aux particules pré-40S dans le noyau (Gelperin *et al.*, 2001; Leger-Silvestre *et al.*, 2004). Cet intermédiaire, le pré-ARNr 20S, est issu du clivage au site A₂ dans l'ITS1. Si nous essayons de faire un parallèle pour ce processus entre levure et homme, du point de vue des clivages, Tsr1 serait impliqué dans la maturation de l'ITS1 suite au clivage au site A₂/2. Donc chez l'homme, ce facteur serait requis pour la maturation du pré-ARNr 21S en pré-ARNr 21S-C ou 18S-E. Or, suite à la perte d'expression de hTsr1, aucun intermédiaire ne s'accumule sur des Northern blot d'extraits totaux. De la même manière, si nous abordons la comparaison du point de vue des intermédiaires, Tsr1 serait impliqué dans la dernière étape de maturation de l'ARNr 18S dans le cytoplasme, i.e. la production de l'ARNr 18S à partir du pré-ARNr 20S/18S-E. Cependant, les particules pré-40S s'accumulent dans le nucléoplasme et non dans le cytoplasme dans les cellules humaines n'exprimant pas hTsr1. Il est donc difficile de trouver des similitudes afin de comparer les différents stades de maturation entre l'homme et la levure. Une hypothèse serait que Tsr1 soit requise pour structurer le pré-ARNr 20S/18S-E afin qu'il puisse subir une maturation ou être apte à passer le pore nucléaire.

De la même manière que pour *bystine/Enp1*, il serait intéressant d'étudier la capacité de complémentation de *hTsr1* chez la levure et de *Tsr1p* dans les cellules humaines. Cette étude pourrait indiquer si ces 2 orthologues présentent des redondances de fonctions entre les 2 organismes ou si la variation du couplage maturation/export entraîne des fonctionnalités différentes de ces facteurs pré-ribosomiques selon l'organisme.

Enfin, les étapes supplémentaires de maturation décrites chez les mammifères mettent en exergue la nécessité d'étudier ce processus de manière plus approfondie dans ces organismes pluricellulaires. Bien que la levure soit un organisme facilement manipulable du point de vue génétique, ce processus de biogenèse ribosomique n'est pas soumis, comme nous l'avons vu, aux mêmes mécanismes et ni aux mêmes contraintes chez la levure et chez les mammifères. Par ailleurs, de nombreuses maladies ont été associées à des mutations affectant les gènes codant certaines protéines ribosomiques ou à des dérégulations de ce processus. Idéalement, l'étude du lien entre ribosomes et maladies humaines devrait être analysé dans des organismes modèles pluricellulaires. Toutefois, aucun modèle animal ne s'est montré satisfaisant à ce jour.

B – Mitose et biogenèse des ribosomes

Le comportement pendant la mitose des protéines nucléolaires impliquées dans la biogenèse des ribosomes a été décrit de manière très détaillée et par le biais d'approches variées (Angelier *et al.*, 2005; Dousset *et al.*, 2000; Dundr and Olson, 1998; Dundr *et al.*, 2000; Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999; Leung *et al.*, 2004; Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001; Sirri *et al.*, 2000; Sirri *et al.*, 2002). Lors de la division cellulaire, la maturation des pré-ARNr est inhibée et ces protéines adoptent différentes localisations selon les phases mitotiques. Elles sont parfois diffuses dans le cytosol, concentrées en gaine autour des chromosomes ou encore présentes dans les NDFs et PNBs. Les pré-ARNr présentent

également des localisations différentes selon la phase de la mitose, et forment une gaine autour des chromosomes de la prométaphase à l'anaphase, et dans les NDFs et les PNBs de l'anaphase jusqu'en G1. La localisation péri-chromosomique des pré-ARNr ainsi que des protéines impliquées dans leur maturation laisse supposer que les pré-ARNr et les facteurs pré-ribosomiques restent assemblés sous forme de particules pré-ribosomiques lors de la mitose. Cependant, des expériences de FRET ont mis en évidence qu'en métaphase, lorsque les protéines nucléolaires sont concentrées dans la gaine péri-chromosomique, elles n'interagissaient pas entre elles (Angelier *et al.*, 2005). Cependant, Angelier *et al.* (2005) ont analysé l'interaction entre 2 protéines nucléolaires, B23 et Nop52. Nous pouvons supposer que les pré-ARNr sont en complexes avec certains facteurs pré-ribosomiques, et que les protéines impliquées directement dans les clivages endo- ou exo-nucléolytiques présentent lors de la mitose des modifications post-traductionnelles inhibant leur interaction avec les particules pré-ribosomiques (Pinol-Roma, 1999).

Le recrutement des protéines nucléolaires des PNBs vers les nucléoles néo-formés est ordonné selon leur stade d'implication dans la biogenèse des ribosomes, les plus précoces étant recrutées les premières (Dousset *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2004; Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001; Sirri *et al.*, 2000; Sirri *et al.*, 2002). Une hypothèse concernant la régulation de ce recrutement est qu'elle dépendrait de la stabilité des pré-ARNr contenus dans les PNBs. Selon cette hypothèse, les pré-ARNr serviraient de plateforme afin que les facteurs pré-ribosomiques sous forme de pré-complexes. Une fois ces pré-complexes formés, ils seraient libérés grâce à la dégradation des pré-ARNr, et ce en fonction de leur stade d'implication. Plus le pré-ARNr serait précoce, plus il serait instable, permettant donc d'ordonner la libération des pré-complexes afin que ceux-ci rejoignent les nucléoles.

Nos travaux mettent en évidence pour la première fois un lien entre maturation ribosomique et réorganisation nucléolaire post-mitotique. Ils apportent une base moléculaire et mécanistique puisqu'ils mettent en évidence la nécessité de la reprise de la maturation

des pré-ARNr pour une résorption complète des PNBs. Pendant la mitose, les pré-ARNr, arrêtés dans leur maturation avant la division cellulaire, se rassembleraient dans les PNBs, avec les protéines nucléolaires. La maturation des pré-ARNr reprendrait également au sein de ces structures, permettant la libération séquentielle des facteurs pré-ribosomiques, une fois leur action effectuée. Ce modèle mécanistique est en accord avec les descriptions de la séquentialité de relocalisation des protéines nucléolaires des PNBs aux nucléoles (Dousset *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2004; Savino *et al.*, 1999; Savino *et al.*, 2001; Sirri *et al.*, 2000; Sirri *et al.*, 2002).

Nous pouvons nous interroger quant à l'intérêt de telles structures et d'un tel mécanisme. En effet, les pré-ARNr ainsi que les facteurs pré-ribosomiques nucléolaires pourraient directement se relocaliser dans les nucléoles néo-formés en sortie de mitose plutôt que de se concentrer dans les PNBs avant d'être recrutés aux nucléoles. Une première hypothèse serait que de telles structures servent de lieu de stockage pour libérer au fur et à mesure les protéines nucléolaires. De fait, les facteurs pré-ribosomiques les plus précoces pourraient interagir de manière rapide avec le pré-ARNr 47S en cours de transcription, tandis que les facteurs intervenant plus tardivement seraient retenus à des sites plus distants. Les PNBs pourraient être présents dans le nucléoplasme afin de permettre une libération ordonnée des facteurs pré-ribosomiques pour que ces derniers rejoignent progressivement les nucléoles.

Une deuxième hypothèse quant à la fonction de ces structures serait que les PNBs permettent le contrôle du bon fonctionnement de la machinerie de maturation des particules pré-ribosomiques. Cette hypothèse est confortée par le fait que lorsque la biogenèse des ribosomes est défectueuse, par exemple lors de la perte d'expression d'une protéine ribosomique ou d'un facteur pré-ribosomique, il y a une persistance de PNBs dans le nucléoplasme. Ces PNBs résiduels sont composés de particules pré-ribosomiques bloquées dans leur maturation, dont les composants protéiques ne peuvent plus rejoindre les

nucléoles nouvellement formés. Pour pouvoir tester cette hypothèse, nous pourrions analyser la dynamique des protéines au sein de ces structures par des expériences de FRAP. Des études de ce type ont été menées dans des cellules témoins, mettant en évidence une dynamique des protéines nucléolaires entre les différents PNBs et entre le nucléole et les PNBs (Dundr *et al.*, 2000). La comparaison entre les temps de retour de fluorescence au sein des PNBs résiduels et ceux obtenu dans des PNBs de cellules contrôles pourrait amener des données supplémentaires quant à cette hypothèse.

D'autre part, nous avons également montré que la persistance des corps pré-nucléolaires est associée à un arrêt des cellules en phase G1. Une autre hypothèse concernant la fonction des PNBs serait que l'arrêt de la maturation des pré-ARNr au sein de ces structures constituerait un signal induisant l'arrêt du cycle. L'haploinsuffisance ou la perte d'une protéine ou d'un facteur ribosomique pourrait donc induire un tel signal et agir sur la progression du cycle cellulaire, comme le montrent nos résultats.

Cette persistance des PNBs n'est cependant pas observée quelle que soit la protéine ribosomique dont l'expression est abolie. Seule la perte d'expression de 13 RPS (sur un total de 32 RPS), d'1 facteur pré-ribosomique (sur 3 testés) et de 2 RPL (sur 4 testées) entraîne ce phénotype. Pour expliquer l'existence d'un tel sous-groupe de protéines ribosomiques, une hypothèse serait que l'absence de ces protéines conduirait simplement à une accumulation excessive d'intermédiaires. L'absence d'une autre protéine ribosomique n'induisant pas ce phénotype pourrait au contraire entraîner la formation de particules structurellement non viables, ce qui conduirait à leur dégradation et donc ne provoquerait pas l'accumulation de PNBs. Afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'inactiver l'expression d'une protéine ribosomique n'entraînant pas de r-PNBs ainsi que de EXOSC10/PM-Scl100, composant de l'exosome impliqué dans la maturation des pré-ARNr (Kent *et al.*, 2008).

La perte d'une des protéines ribosomique induisant la persistance des PNBs serait suffisante pour inhiber la résorption des PNBs lors de la phase G1. Par ricochet, cette classe de protéines constituerait des « sentinelles » vis-à-vis de la résorption des PNBs, et constituerait un point de contrôle essentiel pour la biogenèse des ribosomes, la reformation des nucléoles en sortie de mitose et le contrôle du cycle cellulaire.

Un nombre croissant d'études menées ces dernières années a mis en évidence un lien entre défaut de la biogenèse des ribosomes et activation de la voie p53 (Lindstrom and Zhang, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Il serait donc probable que suite à la mitose, des défauts critiques lors de la reprise de la maturation des pré-ARNr activent les voies de contrôle du cycle. Nos données mettent en parallèle une désorganisation du nucléole en sortie de mitose et un défaut de progression à travers la phase G1. Elles permettent d'envisager une voie d'étude du dialogue existant entre biogenèse ribosomique et cycle cellulaire, par le biais de certaines protéines ribosomiques ou de facteurs pré-ribosomiques. Mener ces expériences de persistance de corps pré-nucléolaires dans des cellules U2OS, qui expriment p53, permettrait d'analyser si l'arrêt du cycle cellulaire observé lors de la présence de r-PNBs est aboli par la perte d'expression de p53. Sachant que cet arrêt du cycle est observé dans des cellules HeLa, qui n'expriment pas p53, il est envisageable qu'une autre voie de contrôle du cycle soit impliquée dans cet arrêt du cycle. L'exploration et l'identification du lien existant entre certaines protéines ribosomiques et p53 contribueraient donc à caractériser la voie en cause dans ce (ou ces) mécanisme(s). À plus long terme, l'identification de ces voies de régulation et de leurs intervenants moléculaires pourrait permettre la mise à jour de nouveaux suppresseurs de tumeur ou de nouvelles cibles pour la thérapie anticancéreuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A – Culture cellulaire et traitement par des inhibiteurs

Les cellules HeLa de carcinome cervical humain ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du Glutamax® en tant que réserve de L-glutamine et complémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été placées à 37°C dans une atmosphère enrichie par 5% de CO₂. La transcription par l'ARN polymérase I a été sélectivement inhibée par 50 ng/ml d'actinomycine D pendant 2 heures. L'export nucléaire dépendant de Crm1 a été bloqué par l'addition dans le milieu de culture de leptomycine B à 10 mM final pendant 2 heures.

B – Plasmides

Pour construire les plasmides pEGFP-bystin, pEGFP-hTsr1 et pEGFP-hNoc4, les ADNc de bystin, hTsr1 et hNoc4 ont été générés par RT-PCR et clonés dans les sites HindIII et XbaI du plasmide pEGFP-C3 (Clontech Laboratories) en phase avec la séquence codant la GFP. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification des ADNc étaient les suivants :

HindIII-bystin sens: 5'-CTCAAGCTTCCTGGACCTGGAATGCCCAAATTC AAGGCGGC-3'

bystin-XbaI anti-sens: 5'-GCTTGTCTAGATCACTCCACGGTGATGGGAA-3'

HindIII-hTsr1 sens: 5'-CTCAAGCTTCCTGGACCTGGAATGGCGGCCACCGCCC-3'

hTsr1-XbaI anti-sens: 5'-GCTTGTCTAGATTACTCCATGCCCCCTTGAG-3'

HindIII-hNoc4 sens: 5'-CTCAAGCTTCCTGGACCTGGAATGGAGCGGGAGCCGGG-3'

hNoc4-XbaI anti-sens: 5'-CGTTGTCTAGATCAGCTGAGCGTGAAGTGCT-3'

Les plasmides p3XFlag-bystin, p3XFlag-hTsr1 et p3XFlag-hNoc4 ont été construits par transfert des ADNc des plasmides pEGFP vers le plasmide p3Xflag grâce aux sites uniques de restriction HindIII et XbaI présents sur ces deux plasmides.

C – Inhibition de l’expression des gènes par des petits ARN interférants

Deux ou trois duplexes de siARN de 21-mer ont été dessinés et synthétisés par Eurogentec pour diminuer l’expression des ARNm correspondant aux gènes humains codant bystin (numéro d’accession GenBank: NM_004053), hTsr1 (numéro d’accession GenBank: NM_018128), hNoc4 (numéro d’accession GenBank: NM_024078), hRio2 (numéro d’accession GenBank: NM_018343), hRPS5 (numéro d’accession GenBank: NM_001009), hRps6 (numéro d’accession GenBank: NM_001010), hRPS15 (numéro d’accession GenBank: NM_001018), hRPS19 (numéro d’accession GenBank: NM_001022), hRPS24 (numéro d’accession GenBank: NM_033022) et hRPS29 (numéro d’accession GenBank: NM_001032). Après un lavage des cellules avec du DMEM (sans sérum ni antibiotiques), 10 µl d’une solution de siARN à 100 µM ont été ajoutés à 10⁷ cellules HeLa en suspension dans 200 µl de milieu sans sérum. L’électro-transformation a été réalisée à 250 volts et à 950 µF avec un Gene Pulser (Bio-Rad), dans une cuvette ayant une distance inter-electrode de 4 mm. Les cellules en suspension ont ensuite été déposées dans une boîte de Pétri de 200 cm² contenant 20 ml de DMEM complété avec du SVF et des antibiotiques. Les échantillons contrôles ont été électro-transformés avec un siARN « scramble » (duplex de siARN contrôle négatif ; Eurogentec).

L’efficacité de la diminution de l’expression des gènes par les siARN a été quantifiée par des réactions de RT-PCR quantitative, en prenant la GAPDH comme contrôle interne de normalisation de l’expression des gènes cibles. Les duplexes de siARN utilisés étaient les suivants :

- un mélange de : *bystin-1* (5'-cugcccaaggcauuuaaga-3') et *bystin-2* (5'-gagguugagacagucaugu-3')
- *tsr1-1* : 5'-cuggaacaguacacuugaa-3'
- *noc4-1* : 5'-gcgcacuccugaaguugu-3'
- *rio2-1* : 5'-acaugguggcuguauuaaa-3'

- *rps5-1* : 5'-ccgaugaugugcagaucaa-3'
- *rps6-1* : 5'-gacgcagacuuuccucucu-3'
- *rps15-2* : 5'-ucaccuacaagcccguaaa-3'
- *rps19-1* : 5'-agagcuugcucccuacgau-3'
- *rps24-2* : 5'-ggaaacaaauggucauuga-3'
- *rps29-1* : 5'-cggucugauccggaaauau-3'
- *rpl5-2* : 5'-gccagaauguugcagauua-3'

D – Extraction des ARN totaux et qRT-PCR

Après un traitement de 48 h par les siARNs, les cellules ont été lavées avec du PBS puis décollées à l'aide de la trypsine. Les cellules en suspension ont été reprises dans du DMEM contenant du SVF, centrifugées puis le culot a été rincé par du PBS maintenu à 4°C. Le culot récupéré par centrifugation à 300 g et à 4°C pendant 5 min a été repris dans 1 ml de Trizol, puis 200 µl de chloroforme ont été ajoutés à ce mélange. La phase aqueuse contenant les ARNs a été récupérée et ceux-ci ont ensuite été précipités avec de l'isopropanol. Après une centrifugation de 15 min à 12 000 g, le culot a été lavé avec de l'éthanol. Après séchage, les ARNs ont été repris dans l'H₂O ou dans la formamide puis quantifiés grâce à un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Les solutions ont été diluées à 1 µg/µl puis stockées à -80°C.

Pour générer des ADNc, 1-2 µg d'ARN totaux ont été dilués dans 11 µl d'H₂O et mélangés avec 1 µl d'oligo dT₍₁₈₎, puis incubés pendant 2 h à 42°C avec la reverse transcriptase. Les cDNA ont été dilués au 1/100^{ème}, mélangés avec 200 nM d'oligonucléotides sens et anti-sens correspondants, puis le mélange réactionnel contenant le SybrGreen a été ajouté. Les échantillons ont été déposés en triplicats sur une plaque de 96 puits, puis analysés sur un Mastercyle Realplex⁴ (Eppendorf). Les amplifications d'ADNc ont été réalisées selon 40 cycles comprenant une phase de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, une phase

d'hybridation des amorces pendant 30 sec à 56°C et une phase d'élongation à 72°C pendant 30 sec.

E – Fractionnement sub-cellulaire

Après 48 h de traitement avec les siARN, les cellules ont été lavées successivement avec du DMEM, du PBS 1X et du tampon A (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl). Un dixième de la suspension a été conservé pour l'extraction des ARN totaux. Les cellules sont cassées mécaniquement avec un homogénéisateur Dounce (piston B) dans du tampon A additionné de 0,5 mM de DTT. Le nombre d'allers et retours nécessaires a été ajusté en contrôlant l'efficacité du cassage mécanique au microscope. Après une centrifugation à 1 000 g et à 4°C pendant 10 min, le surnageant (i.e. la fraction cytoplasmique) a été récupéré. Ensuite, la fraction cytoplasmique a été congelée puis analysée sur gradient de saccharose, ou bien les ARNs cytoplasmiques ont été extraits au Trizol. Les culots contenant les noyaux ont été lavés avec une solution composée de 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 3,3 mM MgCl₂, 250 mM saccharose. Après centrifugation, pour une analyse des pré-ribosomes nucléaires sur gradient de saccharose, les noyaux ont été remis en suspension dans une solution de 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, contenant 100 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,05% NP-40, 1mM NaF, 40 µg/ml PMSF, Complete 1X et 0,1 µl/ml de Rnasine. La suspension obtenue a été placée pendant 6 min à 4°C dans un bain sonicant (mode « high » avec des impulsions de 15 sec alternées par des pauses de 30 sec). Après centrifugation à 2 000 g et à 4°C pendant 15 min, le surnageant a été congelé avant d'être déposé sur un gradient de saccharose. Pour l'extraction des ARNs nucléaires après centrifugation, les noyaux sont remis en suspension dans une solution contenant 10 mM MgCl₂ et 250 mM saccharose, puis purifiés par centrifugation pendant 10 min à 500 g sur un coussin de saccharose (0,5 mM MgCl₂, 350 mM saccharose). L'extrait nucléaire purifié a alors été lysé dans 10 volumes d'une solution contenant 50 mM d'acétate de Na, pH 5,1, 140 mM NaCl et 0,3% SDS. Les ARNs

nucléaires ont été isolés par deux extractions au phénol, puis précipités avec 2,5 volumes d'éthanol 100%. Après rinçage à l'éthanol 70%, les culots d'ARNr ont été dissous dans la formamide puis quantifiés au Nanodrop.

F - Analyse des pré-ribosomes et des polysomes par centrifugation sur gradient de saccharose

Quarante-huit heures après transfection, les cellules HeLa ont été traitées avec 100 µg/ml de cycloheximide (Sigma) pendant 10 min. Les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été préparées comme décrit ci-dessus, à la même concentration finale de cycloheximide dans tous les tampons. Pour l'analyse des ribosomes issus de la fraction cytoplasmique, 1 mg de protéines totales a été chargé au sommet de chaque gradient de saccharose 10-50% (P/P) dans le tampon A (10 mM Hepes-KOH, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl). Les gradients ont été formés à l'aide d'un Gradient Master former (BioComp Instruments). Les tubes ont été centrifugés à 36 000 rpm et à 4°C pendant 105 min dans un rotor SW41 (ultracentrifugeuse Optima L100XP, Beckman Coulter). À la fin de la centrifugation, le rotor a été arrêté sans freinage. Pour l'analyse des pré-ribosomes de la fraction nucléaire, 2 mg de protéines ont été déposés sur un gradient de saccharose 10-30% dans le tampon B (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA). Les tubes ont été centrifugés à 38 000 rpm et à 4°C pendant 200 min, sans freinage, dans un rotor SW41. Les fractions des gradients ont été analysées et collectées à une DO_{254nm} avec un collecteur de gradient Froxy Jr. (Teledyne Isco).

Les protéines contenues dans les fractions issues des gradients nucléaires ou cytoplasmiques ont été extraites après incubation pendant 15 min à 4°C en présence de Triton-X100 1,4% final. Elles ont ensuite été précipitées par l'addition de trichloroacétate (TCA) 30% final, puis récupérées par centrifugation à 13 000 rpm et à 4°C pendant 30 min. Le culot a été remis en suspension dans 1 ml d'acétone à l'aide d'un agitateur Vortex pendant 45 sec. Les protéines

ont été récupérées par une centrifugation de 30 min à 13 000 rpm. Le culot a été lavé 2 fois par 1 mL d'acétone, puis repris dans du tampon échantillon 1X. Après dénaturation à 96°C, les extraits protéiques ont été congelés à -20°C, puis déposés sur un gel dénaturant de polyacrylamide.

Les ARNr issus des fractions du gradient nucléaire ont été précipités à l'éthanol après l'addition de SDS 0,6% final suivie par deux extractions successives au phénol/chloroforme à chaud (65°C).

G – Analyse des pré-ARNr

Les différentes espèces de pré-ARNr ont été analysées par Northern blot. Les ARNs (3 µg/puits pour les extraits totaux ou nucléaires, 6 µg/puits pour les extraits cytoplasmiques) ont été mélangés avec 3 volumes de tampon de charge (25 mM MOPS, 6% formaldéhyde, 1,5% formamide, 0,16 µg/mL bromure d'éthidium) et séparés à 140 volts sur un gel d'agarose 1% en présence de tampon MOPS (20 mM MOPS pH 7,0, 6 mM acétate de sodium, 0,07 N NaOH, 0,5 M EDTA, pH 8,0, 6% formaldéhyde) dans un tampon de migration MOPS/formaldéhyde (MOPS 1X, 6% formaldéhyde). Alternativement, les ARNs ont été séparés sur un gel agarose 1% en présence de tampon Tri/Tri (30 mM Tri-éthanolamine, 30 mM Tricine, pH 7,9) et de formaldéhyde 1,2%. La migration a été réalisée dans le tampon Tri/Tri à 140 volts. Les ARNs ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon Hybond N⁺ (GE Healthcare). Après fixation par les UV, les membranes ont été pré-hybridées pendant 1 heure à 45°C dans un tampon contenant 6X SSC, 5X de tampon Denhardt, du SDS 0,5% et des ARNt à 0,9 µg/mL. Les sondes oligonucléotidiques marquées au ³²P ont ensuite été ajoutées et incubées avec la membrane à 45°C sur la nuit. Les différentes sondes utilisées étaient les suivantes :

- 18S : 5'-tttacttctctagatagtaagttcgacc-3'

- 5'ITS1 : 5'-cctcgccctccgggctccgtaatgatc-3'

- ITS1-160 : 5'-tctccctcccagttctcgg-3'
- ITS1-605 : 5'-ttaaacctccgcccgaac-3'
- ITS1-639 : 5'-gaccacgggacggcgatc-3'
- ITS1-721 : 5'-ggagcggagtcggtg-3'
- ITS1-779 : 5'-gtaaagccccaccgacggc-3'
- ITS2b : 5'-ctgcgaggaacccccagccgca-3'
- ITS2d/e : 5'-gcgcgacggcgacaccgcgctc-3'
- 28S: 5'-cccgtcccttgctgtggttcgctagata-3'
- actine : 5'-agggatagcacagcctggatagcaac-3'

Pour la détection de l'ITS2, les sondes ITS2b et ITS2d/e ont été mélangées en quantités équivalentes. Après l'hybridation, les membranes sont lavées 2 fois pendant 10 min à température ambiante dans un tampon SSC 2X SDS 0,1%, et une fois pendant 10 min dans un tampon SSC 1X SDS 0,1%. Les membranes ont été exposées sur un écran sensible aux rayonnements β . Les signaux ont été enregistrés avec un Phosphoimager FLA2000 (Fuji) puis quantifiés avec le logiciel ImageGauge.

H – Détection des protéines fluorescentes, hybridation *in situ* et immunofluorescence

Pour la détection des protéines fluorescentes après une transfection transitoire, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre pendant 48 h. Après 2 lavages au PBS, les cellules ont été fixées pendant 30 min dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA). Les lamelles ont ensuite été lavées au PBS puis l'ADN a été contre-coloré avec 1 μ g/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes) avant le montage dans du Mowiol 4.88 (Polyscience Inc.).

Pour les expériences d'hybridation *in situ* (FISH), les cellules ont été fixées dans les mêmes conditions, rincées au PBS puis perméabilisées dans l'éthanol 70% sur la nuit à 4°C. Les cellules ont ensuite été brièvement réhydratées dans le tampon SSC 2X contenant 10% de formamide. L'hybridation en présence des sondes fluorescentes (0,5 ng/ml) a alors été réalisée durant 3 à 4 h dans le noir et à 37°C dans un tampon contenant 10% formamide, 2X SSC, 0,5 mg/ml ARNt, 10% dextran sulfate, 250 µg/ml sérum albumine bovine (SAB), 10 mM VRC (vanadyle ribonucleoside complexes). Les sondes ont été préalablement conjuguées aux fluorophores Cy3 ou Cy5 sur les désoxy-thimidines amino-modifiées. Les sondes utilisées étaient les suivantes :

- ETS1 b : 5'-agacgacaacgcctgacacgcacggcac-3'
- ETS1-1399 : 5'-cgctagagaaggcttttctc-3'
- ETS1-18S : 5'-gatcaaccaggtagtaaggtagagcgcgga-3'
- 5'ITS1 : 5'-cctcgccctccgggctccgtaatgatc-3'
- ITS1-160 : 5'-tctccctcccagttctcgg-3'
- 3'ITS1 : 5'-gtcgattggcgaggcgctcccacgac-3'
- 5.8S-ITS2 : 5'-gcgattgatcggaagcgacgctc-3'
- 28S-ETS2 : 5'-gcacgcacgcgcgcggaacccaac-3'

Après 2 lavages de 30 min avec du SSC 2X contenant 10% de formamide, les lamelles ont été rincées avec du PBS puis l'ADN a été contre-coloré avec du Hoechst 1 µg/ml. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les lamelles ont été rincées 2 fois au PBS puis montées dans du Mowiol.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules ont été fixées pendant 20 min au PFA 4% puis rincées 2 fois au PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées à température ambiante pendant exactement 5 min en présence de Triton X-100 0,1% et de SDS 0,02% dans le tampon PBS. Après plusieurs rinçages, les sites non spécifiques ont été saturés par incubation dans une solution de 2% SAB dans du PBS (SAB-PBS) pendant 10 min, puis dans

10% de sérum de chèvre dans du SAB-PBS pendant au moins 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire pendant 1 h en chambre humide. Après 2 lavages au SAB-PBS, les lamelles ont été incubées en chambre humide pendant 30 min avec un anticorps secondaire approprié, couplé à une molécule fluorescente (dilution 1/1000). Les cellules ont ensuite été lavées puis sur-fixées pendant 15 min au PFA 4%. L'ADN a été contre-coloré 1 µg/ml de Hoechst puis les lamelles montées dans du Mowiol.

Les observations ont été effectuées sur un microscope inversé IX-81 (Olympus), équipé d'une platine motorisée (Märzhäuser) et d'une caméra Coolsnap HQ (Photometrics), et piloté par MetaMorph (Molecular Devices). Les cellules ont été observées à l'aide d'un objectif à immersion à l'huile de grandissement 100X et d'ouverture numérique 1,4, monté sur un moteur piezo PIFOC®. La source de lumière était un monochromateur Polychrome V (Till Photonics GmbH) équipé d'une lampe à vapeurs de Xénon d'une puissance de 150 W. Pour l'observation des marquages multiples, des miroirs dichroïques multibandes (Chroma) ont été utilisés pour éviter un décalage des pixels dans le plan d'acquisition. Des filtres d'émission monobande montés sur une roue motorisée placée devant la caméra ont été utilisés. Pour une même expérience, les images ont été acquises avec le même temps d'exposition pour tous les échantillons. La quantification de la fluorescence contenue dans des régions d'intérêt a été faite sur des images 12-bit à l'aide du logiciel MetaMorph. Après soustraction du bruit de fond, les résultats ont été exprimés en nombre de niveaux de gris par pixel. Pour chaque cellule d'intérêt, une mesure représentative du nucléoplasme et du cytoplasme a été obtenue en quantifiant la fluorescence au sein de 4 régions d'intérêt de taille identique.

I – Analyses des protéines par Western blot

Les cellules transfectées transitoirement ont été cultivées pendant 48 h. Après 2 lavages au PBS froid, les cellules ont été lysées en présence de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4

contenant 1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA et 1X Complete. Après avoir décollé les cellules à l'aide d'un grattoir, elles ont été récupérées avec une pipette puis placées sous agitation à 4°C pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à 13 000 g et à 4°C, la quantité de protéines totales a été dosée dans le surnageant selon la méthode de Bradford. Environ 20 à 50 µg de protéines totales ont été mélangés avec du tampon d'échantillon 2X (130 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glycérol, 4,6% SDS, 0,02% bleu de Bromophénol, 0,02% DTT). Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 à 10 min à 95°C avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide.

Pour analyser l'association des protéines étiquetées aux pré-ribosomes, les protéines contenues dans chaque fraction des gradients ont été précipitées au TCA selon le protocole décrit dans la section F.

Après migration sur gel de polyacrylamide 8-12% en milieu dénaturant, les protéines ont été électro-transférées sur une membrane de nylon Hybond-C Extra (Amersham) en milieu semi-sec. Le gel a été incubé pendant 30 min dans le tampon de transfert (250 mM NaHCO₃, 75 mM Na₂CO₃ et 20% méthanol) tandis que la membrane a été incubée pendant 5 min dans le tampon de transfert. Les protéines ont été transférées pendant 1 h à un ampérage compris entre 1 et 3 mA par cm² de gel, à 25 volts maximum.

La membrane a ensuite été placée pendant 30 min à température ambiante dans le tampon de saturation (PBS 1X, 5% lait en poudre, 0,5% Tween 20). La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire à 4°C sur la nuit ou pendant 1 h à température ambiante, puis lavée 3 fois dans le tampon de saturation et incubée pendant 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris, couplé à la peroxydase). Après 3 lavages avec la solution de saturation, la membrane a été incubée dans le réactif ECL (GE Healthcare) puis les signaux ont été révélés grâce à un Bioimager LAS 4000.

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, K., C. Soeta-Saneyoshi, H. Sagara, and Y. Iwakura. 2007. Crucial role of Bysl in mammalian preimplantation development as an integral factor for 40S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 27:2202-2214.
- Ajuh, P. M., P. A. Heeney, and B. E. Maden. 1991. *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis* 28S ribosomal DNA and the complete 40S ribosomal precursor RNA coding units of both species. *Proc Biol Sci.* 245:65-71.
- Alter, B. P., G. M. Baerlocher, S. A. Savage, S. J. Chanock, B. B. Weksler, J. P. Willner, J. A. Peters, N. Giri, and P. M. Lansdorp. 2007. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood.* 110:1439-1447.
- Amsterdam, A., K. C. Sadler, K. Lai, S. Farrington, R. T. Bronson, J. A. Lees, and N. Hopkins. 2004. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol.* 2:E139.
- Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond, and M. Mann. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature.* 433:77-83.
- Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann, and A. I. Lamond. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol.* 12:1-11.
- Angelier, N., M. Tramier, E. Louvet, M. Coppey-Moisan, T. M. Savino, J. R. De Mey, and D. Hernandez-Verdun. 2005. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell.* 16:2862-2871.
- Aoki, R., N. Suzuki, B. C. Paria, K. Sugihara, T. O. Akama, G. Raab, M. Miyoshi, D. Nadano, and M. N. Fukuda. 2006. The Bysl gene product, bystin, is essential for survival of mouse embryos. *FEBS Lett.* 580:6062-6068.
- Aris, J. P., and G. Blobel. 1991. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:931-935.
- Arnez, J. G., and T. A. Steitz. 1994. Crystal structure of unmodified tRNA(Gln) complexed with glutamyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure. *Biochemistry.* 33:7560-7567.

- Auger-Buendia, M. A., and M. Longuet. 1978. Characterization of proteins from nucleolar preribosomes of mouse leukemia cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem.* 85:105-114.
- Austin, K. M., M. L. Gupta, S. A. Coats, A. Tulpule, G. Mostoslavsky, A. B. Balazs, R. C. Mulligan, G. Daley, D. Pellman, and A. Shimamura. 2008. Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome. *J Clin Invest.* 118:1511-1518.
- Azzam, R., S. L. Chen, W. Shou, A. S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R. S. Annan, S. A. Carr, and R. J. Deshaies. 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science.* 305:516-519.
- Bassler, J., P. Grandi, O. Gadal, T. Lessmann, E. Petfalski, D. Tollervey, J. Lechner, and E. Hurt. 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell.* 8:517-529.
- Bataille, N., T. Helser, and H. M. Fried. 1990. Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J Cell Biol.* 111:1571-1582.
- Bazett-Jones, D. P., B. Leblanc, M. Herfort, and T. Moss. 1994. Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science.* 264:1134-1137.
- Belin, S., A. Beghin, E. Solano-Gonzalez, L. Bezin, S. Brunet-Manquat, J. Textoris, A. C. Prats, H. C. Mertani, C. Dumontet, and J. J. Diaz. 2009. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One.* 4:e7147.
- Bell, S. P., H. M. Jantzen, and R. Tjian. 1990. Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev.* 4:943-954.
- Beven, A. F., R. Lee, M. Razaz, D. J. Leader, J. W. Brown, and P. J. Shaw. 1996. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci.* 109:1241-1251.
- Bierhoff, H., M. Dundr, A. A. Michels, and I. Grummt. 2008. Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Mol Cell Biol.* 28:4988-4998.

- Blasco, M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 3:640-649.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, and C. W. Greider. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 91:25-34.
- Boocock, G. R., J. A. Morrison, M. Popovic, N. Richards, L. Ellis, P. R. Durie, and J. M. Rommens. 2003. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet.* 33:97-101.
- Borovjagin, A. V., and S. A. Gerbi. 1999. U3 small nucleolar RNA is essential for cleavage at sites 1, 2 and 3 in pre-rRNA and determines which rRNA processing pathway is taken in *Xenopus* oocytes. *Journal of Molecular Biology.* 286:1347-1363.
- Borovjagin, A. V., and S. A. Gerbi. 2001. *Xenopus* U3 snoRNA GAC-Box A' and Box A sequences play distinct functional roles in rRNA processing. *Mol Cell Biol.* 21:6210-6221.
- Bourbon, H., B. Michot, N. Hassouna, J. Feliu, and J. P. Bachellerie. 1988. Sequence and secondary structure of the 5' external transcribed spacer of mouse pre-rRNA. *DNA.* 7:181-191.
- Bowman, L. H., W. E. Goldman, G. I. Goldberg, M. B. Hebert, and D. Schlessinger. 1983. Location of the initial cleavage sites in mouse pre-rRNA. *Mol Cell Biol.* 3:1501-1510.
- Bowman, L. H., B. Rabin, and D. Schlessinger. 1981. Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 9:4951-4966.
- Brand, R. C., J. Klootwijk, R. J. Planta, and B. E. Maden. 1978. Biosynthesis of a hypermodified nucleotide in *Saccharomyces carlsbergensis* 17S and HeLa-cell 18S ribosomal ribonucleic acid. *Biochem J.* 169:71-77.
- Brun, R. P., K. Ryan, and B. Sollner-Webb. 1994. Factor C*, the specific initiation component of the mouse RNA polymerase I holoenzyme, is inactivated early in the transcription process. *Mol Cell Biol.* 14:5010-5021.
- Cavaille, J., A. A. Hadjiolov, and J. P. Bachellerie. 1996. Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA. *Eur J Biochem.* 242:206-213.

- Cavanaugh, A. H., A. Evans, and L. I. Rothblum. 2008. Mammalian Rrn3 is required for the formation of a transcription competent preinitiation complex containing RNA polymerase I. *Gene Expr.* 14:131-147.
- Cavanaugh, A. H., and E. A. J. Thompson. 1985. Hormonal regulation of transcription of rDNA: glucocorticoid effects upon initiation and elongation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 13:3357-3369.
- Chan, E. K., H. Imai, J. C. Hamel, and E. M. Tan. 1991. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med.* 174:1239-1244.
- Chen, D., M. Dunder, C. Wang, A. Leung, A. Lamond, T. Misteli, and S. Huang. 2005. Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J Cell Biol.* 168:41-54.
- Chen, W., J. Bucaria, D. A. Band, A. Sutton, and R. Sternglanz. 2003. Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic Acids Res.* 31:690-699.
- Cheutin, T., M. F. O'Donohue, A. Beorchia, M. Vandelaer, H. Kaplan, B. Defever, D. Ploton, and M. Thiry. 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci.* 115:3297-3307.
- Choismel, V., D. Bacqueville, J. Rouquette, J. Noaillac-Depeyre, S. Fribourg, A. Crétien, T. Leblanc, G. Tchernia, L. Da Costa, and P. E. Gleizes. 2007. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 109:1275-1283.
- Choismel, V., S. Fribourg, A. H. Aguisa-Touré, N. Pinaud, P. Legrand, H. T. Gazda, and P. E. Gleizes. 2008. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet.* 17:1253-1263.
- Cmejla, R., J. Cmejlova, H. Handrkova, J. Petrak, K. Petrylova, V. Mihal, J. Stary, Z. Cerna, Y. Jabali, and D. Pospisilova. 2009. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 30:321-327.
- Cmejla, R., J. Cmejlova, H. Handrkova, J. Petrak, and D. Pospisilova. 2007. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 28:1178-1182.

- Colombo, E., J. C. Marine, D. Danovi, B. Falini, and P. G. Pelicci. 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol.* 4:529-533.
- Comai, L., J. C. Zomerdijk, H. Beckmann, S. Zhou, A. Admon, and R. Tjian. 1994. Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science.* 266:1966-1972.
- Coute, Y., J. A. Burgess, J. J. Diaz, C. Chichester, F. Lisacek, A. Greco, and J. C. Sanchez. 2006. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom Rev.* 25:215-234.
- Coute, Y., K. Kindbeiter, S. Belin, R. Dieckmann, L. Duret, L. Bezin, J. C. Sanchez, and J. J. Diaz. 2008. ISG20L2, a novel vertebrate nucleolar exoribonuclease involved in ribosome biogenesis. *Mol Cell Proteomics.* 7:546-559.
- Da Costa, L., G. Tchernia, P. Gascard, A. Lo, J. Meerpohl, C. Niemeyer, J. A. Chasis, J. Fixler, and N. Mohandas. 2003. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood.* 101:5039-5045.
- Dai, M. S., S. X. Zeng, Y. Jin, X. X. Sun, L. David, and H. Lu. 2004. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol.* 24:7654-7668.
- Denissov, S., M. van Driel, R. Voit, M. Hekkelman, T. Hulsen, N. Hernandez, I. Grummt, R. Wehrens, and H. Stunnenberg. 2007. Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *EMBO J.* 26:944-954.
- Derenzini, M., G. Pasquinelli, M. F. O'Donohue, D. Ploton, and M. Thiry. 2006. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem.* 54:131-145.
- Dixon, J., N. C. Jones, L. L. Sandell, S. M. Jayasinghe, J. Crane, J. P. Rey, M. J. Dixon, and P. A. Trainor. 2006. Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13403-13408.
- Doherty, L., M. R. Sheen, A. Vlachos, V. Choesmel, M. O'donohue, C. Clinton, H. E. Schneider, C. A. Sieff, P. E. Newburger, S. E. Ball, E. Niewiadomska, M. Matysiak, B. Glader, R. J. Arceci, J. E.

- Farrar, E. Atsidaftos, J. M. Lipton, P. E. Gleizes, and H. T. Gazda. 2010. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet.* 86:222-228.
- Dousset, T., C. Wang, C. Verheggen, D. Chen, D. Hernandez-Verdun, and S. Huang. 2000. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell.* 11:2705-2717.
- Draptchinskaia, N., P. Gustavsson, B. Andersson, M. Pettersson, T. N. Willig, I. Dianzani, S. Ball, G. Tchernia, J. Klar, H. Matsson, D. Tentler, N. Mohandas, B. Carlsson, and N. Dahl. 1999. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 21:169-175.
- Dudov, K. P., K. V. Hadjiolova, M. B. Kermekchiev, B. S. Stanchev, and A. A. Hadjiolov. 1983. A 12 S precursor to 5.8 S rRNA associated with rat liver nucleolar 28 S rRNA. *Biochim Biophys Acta.* 739:79-84.
- Dundr, M., T. Misteli, and M. O. Olson. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol.* 150:433-446.
- Dundr, M., and M. O. Olson. 1998. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell.* 9:2407-2422.
- Ebert, B. L., J. Pretz, J. Bosco, C. Y. Chang, P. Tamayo, N. Galili, A. Raza, D. E. Root, E. Attar, S. R. Ellis, and T. R. Golub. 2008. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 451:335-339.
- Eichler, D. C., and N. Craig. 1994. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 49:197-239.
- Evers, R., and I. Grummt. 1995. 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.
- Faber, A. W., H. R. Vos, J. C. Vos, and H. A. Raue. 2006. 5'-end formation of yeast 5.8SL rRNA is an endonucleolytic event. *Biochem Biophys Res Commun.* 345:796-802.
- Fang, F., S. Phillips, and J. S. Butler. 2005. Rat1p and Rai1p function with the nuclear exosome in the processing and degradation of rRNA precursors. *RNA.* 11:1571-1578.

- Farrar, J., M. Nater, E. Caywood, M. Mcdevitt, J. Kowalski, C. Takemoto, C. Talbot, P. Meltzer, D. Esposito, A. Beggs, H. Schneider, A. Grabowska, S. Ball, E. Niewiadomska, C. Sieff, A. Vlachos, E. Atsidaftos, S. Ellis, J. Lipton, H. Gazda, and R. Arceci. 2008. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 112:1582-1592.
- Fath, S., P. Milkereit, A. V. Podtelejnikov, N. Bischler, P. Schultz, M. Bier, M. Mann, and H. Tschochner. 2000. Association of yeast RNA polymerase I with a nucleolar substructure active in rRNA synthesis and processing. *J Cell Biol*. 149:575-590.
- Fatica, A., M. Oeffinger, M. Dlakic, and D. Tollervey. 2003. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol*. 23:1798-1807.
- Fatica, A., and D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 14:313-318.
- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, P. E. Gleizes, H. Tschochner, and P. Milkereit. 2005. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell*. 20:263-275.
- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, H. Kuhn, A. Neueder, S. Jakob, H. Tschochner, and P. Milkereit. 2007. Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins. *Mol Cell*. 28:446-457.
- Filippini, D., I. Bozzoni, and E. Caffarelli. 2000. p62, a novel *Xenopus laevis* component of box C/D snoRNPs. *RNA*. 6:391-401.
- Flygare, J., A. Aspesi, J. C. Bailey, K. Miyake, J. M. Caffrey, S. Karlsson, and S. R. Ellis. 2007. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 109:980-986.
- Fomproix, N., Gebrane-Younes, J., and D. Hernandez-Verdun. 1998. Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *J Cell Sci*. 111:359-372.
- Fomproix, N., and D. Hernandez-Verdun. 1999. Effects of anti-PM-Scl 100 (Rrp6p exonuclease) antibodies on prenucleolar body dynamics at the end of mitosis. *Exp Cell Res*. 251:452-464.
- Ford, E., R. Voit, G. Liszt, C. Magin, I. Grummt, and L. Guarente. 2006. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 20:1075-1080.
- Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu, and F. Fasiolo. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 313:17-42.

- Fujiyama-Nakamura, S., H. Yoshikawa, K. Homma, T. Hayano, T. Tsujimura-Takahashi, K. Izumikawa, H. Ishikawa, N. Miyazawa, M. Yanagida, Y. Miura, T. Shinkawa, Y. Yamauchi, T. Isobe, and N. Takahashi. 2009. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Mol Cell Proteomics*. 8:1552-1565.
- Fujiyama, S., M. Yanagida, T. Hayano, Y. Miura, T. Isobe, F. Fujimori, T. Uchida, and N. Takahashi. 2002. Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*. 277:23773-23780.
- Fukuda, M. N., M. Miyoshi, and D. Nadano. 2008. The role of bystin in embryo implantation and in ribosomal biogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 65:92-99.
- Fukuda, M. N., and S. Nozawa. 1999. Trophinin, tastin, and bystin: a complex mediating unique attachment between trophoblastic and endometrial epithelial cells at their respective apical cell membranes. *Semin Reprod Endocrinol*. 17:229-234.
- Gadal, O., D. Strauss, J. Braspenning, D. Hoepfner, E. Petfalski, P. Philippsen, D. Tollervey, and E. Hurt. 2001a. A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J*. 20:3695-3704.
- Gadal, O., D. Strauss, J. Kessl, B. Trumpower, D. Tollervey, and E. Hurt. 2001b. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol*. 21:3405-3415.
- Gallagher, J. E., D. A. Dunbar, S. Granneman, B. M. Mitchell, Y. Osheim, A. L. Beyer, and S. J. Baserga. 2004. RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev*. 18:2506-2517.
- Ganapathi, K. A., and A. Shimamura. 2008. Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. *Br J Haematol*. 141:376-387.
- Ganapathi, K. A., K. M. Austin, C. S. Lee, A. Dias, M. M. Malsch, R. Reed, and A. Shimamura. 2007. The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood*. 110:1458-1465.

- Ganot, P., M. L. Bortolin, and T. Kiss. 1997a. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell*. 89:799-809.
- Ganot, P., M. Caizergues-Ferrer, and T. Kiss. 1997b. The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev*. 11:941-956.
- Gautier, T., T. Berges, D. Tollervey, and E. Hurt. 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol*. 17:7088-7098.
- Gazda, H. T., M. R. Sheen, A. Vlachos, V. Choemmel, M. O'donohue, H. Schneider, N. Darras, C. Hasman, C. A. Sieff, P. E. Newburger, S. E. Ball, E. Niewiadomska, M. Matysiak, J. M. Zaucha, B. Glader, C. Niemeyer, J. J. Meerpohl, E. Atsidaftos, J. M. Lipton, P. E. Gleizes, and A. H. Beggs. 2008. Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *Am J Hum Genet*. 83:769-780.
- Gazda, H. T., and C. A. Sieff. 2006. Recent insights into the pathogenesis of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 135:149-157.
- Geerlings, T. H., J. C. Vos, and H. A. Raue. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA*. 6:1698-1703.
- Gelperin, D., L. Horton, J. Beckman, J. Hensold, and S. K. Lemmon. 2001. Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA*. 7:1268-1283.
- Gerus, M., C. Bonnart, M. Caizergues-Ferrer, Y. Henry, and A. K. Henras. 2010. Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol*. 30:1130-1144.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J*. 17:1476-1486.
- Gonzalez, I. L., C. Chambers, J. L. Gorski, D. Stambolian, R. D. Schmickel, and J. E. Sylvester. 1990. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *J Mol Biol*. 212:27-35.

- Goodpasture, C., and S. E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 53:37-50.
- Gorski, J. J., S. Pathak, K. Panov, T. Kaschiukovic, T. Panova, J. Russell, and J. C. Zomerdijk. 2007. A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *EMBO J*. 26:1560-1568.
- Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schafer, B. Kuster, H. Tschochner, D. Tollervey, A. C. Gavin, and E. Hurt. 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*. 10:105-115.
- Gratenstein, K., A. D. Heggstad, J. Fortun, L. Notterpek, D. G. Pestov, and B. S. Fletcher. 2005. The WD-repeat protein GRWD1: potential roles in myeloid differentiation and ribosome biogenesis. *Genomics*. 85:762-773.
- Grob, A., P. Roussel, J. E. Wright, B. McStay, D. Hernandez-Verdun, and V. Sirri. 2009. Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *J Cell Sci*. 122:489-498.
- Gurney, T. J. 1985. Characterization of mouse 45S ribosomal RNA subspecies suggests that the first processing cleavage occurs 600 +/- 100 nucleotides from the 5' end and the second 500 +/- 100 nucleotides from the 3' end of a 13.9 kb precursor. *Nucleic Acids Res*. 13:4905-4919.
- Hadjiolova, K. V., O. I. Georgiev, and A. A. Hadjiolov. 1984a. Excess 5'-terminal sequences in the rat nucleolar 28S ribosomal RNA. *Exp Cell Res*. 153:266-269.
- Hadjiolova, K. V., O. I. Georgiev, V. V. Nosikov, and A. A. Hadjiolov. 1984b. Mapping of the major early endonuclease cleavage site of the rat precursor to rRNA within the internal transcribed spacer sequence of rDNA. *Biochim Biophys Acta*. 782:195-201.
- Hadjiolova, K. V., O. I. Georgiev, V. V. Nosikov, and A. A. Hadjiolov. 1984c. Localization and structure of endonuclease cleavage sites involved in the processing of the rat 32S precursor to ribosomal RNA. *Biochem J*. 220:105-116.
- Hadjiolova, K. V., M. Nicoloso, S. Mazan, A. A. Hadjiolov, and J. P. Bachellerie. 1993. Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem*. 212:211-215.

- Hadjiolova, K. V., A. Normann, J. Cavaille, E. Soupene, S. Mazan, A. A. Hadjiolov, and J. P. Bachellerie. 1994. Processing of truncated mouse or human rRNA transcribed from ribosomal minigenes transfected into mouse cells. *Mol Cell Biol.* 14:4044-4056.
- Hanada, K., C. Z. Song, K. Yamamoto, K. Yano, Y. Maeda, K. Yamaguchi, and M. Muramatsu. 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.
- Hannan, K. M., R. D. Hannan, and L. I. Rothblum. 1998. Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci.* 3:d376-98.
- Hannon, G. J., P. A. Maroney, A. Branch, B. J. Benenfield, H. D. Robertson, and T. W. Nilsen. 1989. Accurate processing of human pre-rRNA in vitro. *Mol Cell Biol.* 9:4422-4431.
- Harnpicharnchai, P., J. Jakovljevic, E. Horsey, T. Miles, J. Roman, M. Rout, D. Meagher, B. Imai, Y. Guo, C. J. Brame, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and J. L. J. Woolford. 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell.* 8:505-515.
- Hayano, T., M. Yanagida, Y. Yamauchi, T. Shinkawa, T. Isobe, and N. Takahashi. 2003. Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. *J Biol Chem.* 278:34309-34319.
- Heiss, N. S., S. W. Knight, T. J. Vulliamy, S. M. Klauck, S. Wiemann, P. J. Mason, A. Poustka, and I. Dokal. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet.* 19:32-38.
- Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T. M. Michaelidis, and I. Grummt. 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.
- Heix, J., J. C. Zomerdijk, A. Ravanpay, R. Tjian, and I. Grummt. 1997. Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1733-1738.
- Henras, A. K., J. Soudet, M. G erus, S. Lebaron, M. Caizergues-Ferrer, A. Moug in, and Y. Henry. 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci.* .

- Hernandez-Verdun, D., and T. Gautier. 1994. The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*. 16:179-185.
- Hernandez-Verdun, D., and P. Roussel. 2003. Regulators of nucleolar functions. *Prog Cell Cycle Res*. 5:301-308.
- Ho, J. H., G. Kallstrom, and A. W. Johnson. 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol*. 151:1057-1066.
- Holzel, M., M. Rohrmoser, M. Schlee, T. Grimm, T. Harasim, A. Malamoussi, A. Gruber-Eber, E. Kremmer, W. Hiddemann, G. W. Bornkamm, and D. Eick. 2005. Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol*. 170:367-378.
- Horn, H., and K. Vousden. 2008. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene*. 11.
- Huang, N., S. Negi, A. Szebeni, and M. O. Olson. 2005. Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J Biol Chem*. 280:5496-5502.
- Idol, R. A., S. Robledo, H. Y. Du, D. L. Crimmins, D. B. Wilson, J. H. Ladenson, M. Bessler, and P. J. Mason. 2007. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells Mol Dis*. 39:35-43.
- Iouk, T. L., J. D. Aitchison, S. Maguire, and R. W. Wozniak. 2001. Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis. *Mol Cell Biol*. 21:1260-1271.
- Itahana, K., K. P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi, and Y. Zhang. 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*. 12:1151-1164.
- Jansa, P., and I. Grummt. 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., S. W. Mason, U. Hoffmann-Rohrer, and I. Grummt. 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J.* 17:2855-2864.
- Jeanteur, P., F. Amaldi, and G. Attardi. 1968. Partial sequence analysis of ribosomal RNA from HeLa cells. II. Evidence for sequences of non-ribosomal type in 45 and 32 s ribosomal RNA precursors. *J Mol Biol.* 33:757-775.
- Jimenez-Garcia, L. F., M. L. Segura-Valdez, R. L. Ochs, L. I. Rothblum, R. Hannan, and D. L. Spector. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell.* 5:955-966.
- Jones, N. C., M. L. Lynn, K. Gaudenz, D. Sakai, K. Aoto, J. P. Rey, E. F. Glynn, L. Ellington, C. Du, J. Dixon, M. J. Dixon, and P. A. Trainor. 2008. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med.* 14:125-133.
- Kass, S., N. Craig, and B. Sollner-Webb. 1987. Primary processing of mammalian rRNA involves two adjacent cleavages and is not species specific. *Mol Cell Biol.* 7:2891-2898.
- Kass, S., K. Tyc, J. A. Steitz, and B. Sollner-Webb. 1990. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell.* 60:897-908.
- Kent, T., Y. Lapik, and D. Pestov. 2008. The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. *RNA.* 15:14-20.
- Khanna-Gupta, A., and V. C. Ware. 1989. Nucleocytoplasmic transport of ribosomes in a eukaryotic system: is there a facilitated transport process? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1791-1795.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, and T. Kiss. 1998. Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* 17:797-807.
- Kiss, T., E. Fayet-Lebaron, and B. E. Jady. 2010. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell.* 37:597-606.
- Klootwijk, J., and R. J. Planta. 1989. Isolation and characterization of yeast ribosomal RNA precursors and preribosomes. *Methods Enzymol.* 180:96-109.
- Koberna, K., J. Malinsky, A. Pliss, M. Masata, J. Vecerova, M. Fialova, J. Bednar, and I. Raska. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *J Cell Biol.* 157:743-748.

- Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1803:673-683.
- Kuhn, A., A. Vente, M. Doree, and I. Grummt. 1998. Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol*. 284:1-5.
- Labhart, P., and R. H. Reeder. 1990. A point mutation uncouples RNA 3'-end formation and termination during ribosomal gene transcription in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*. 4:269-276.
- Lang, W. H., and R. H. Reeder. 1995. Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9781-9785.
- Lapik, Y. R., C. J. Fernandes, L. F. Lau, and D. G. Pestov. 2004. Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. *Mol Cell*. 15:17-29.
- Lapik, Y. R., J. M. Misra, L. F. Lau, and D. G. Pestov. 2007. Restricting conformational flexibility of the switch II region creates a dominant-inhibitory phenotype in Obg GTPase Nog1. *Mol Cell Biol*. 27:7735-7744.
- Lastick, S. M. 1980. The assembly of ribosomes in HeLa cell nucleoli. *Eur J Biochem*. 113:175-182.
- Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine, and N. Sonenberg. 1990. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. 345:544-547.
- Lazdins, I. B., M. Delannoy, and B. Sollner-Webb. 1997. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma*. 105:481-495.
- Learned, R. M., T. K. Learned, M. M. Haltiner, and R. T. Tjian. 1986. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell*. 45:847-857.
- Leblanc, B., C. Read, and T. Moss. 1993. Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF interdomain interaction. *EMBO J*. 12:513-525.
- Leger-Silvestre, I., P. Milkereit, S. Ferreira-Cerca, C. Saveanu, J. C. Rousselle, V. Choemmel, C. Guinefoleau, N. Gas, and P. E. Gleizes. 2004. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J*. 23:2336-2347.

- Leung, A. K., D. Gerlich, G. Miller, C. Lyon, Y. W. Lam, D. Lleres, N. Daigle, J. Zomerdijk, J. Ellenberg, and A. I. Lamond. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol.* 166:787-800.
- Lindstrom, M., and Y. Zhang. 2008. Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry.* 283:15568-15576.
- Lipton, J. M., and S. R. Ellis. 2009. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23:261-282.
- Liu, Q., J. C. Greimann, and C. D. Lima. 2006. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell.* 127:1223-1237.
- Lyman, S. K., L. Gerace, and S. J. Baserga. 1999. Human Nop5/Nop58 is a component common to the box C/D small nucleolar ribonucleoproteins. *RNA.* 5:1597-1604.
- Maden, B. E. 1990. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 39:241-303.
- Maggi, L. B. J., M. Kuchenruether, D. Y. Dadey, R. M. Schwoppe, S. Grisendi, R. R. Townsend, P. P. Pandolfi, and J. D. Weber. 2008. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol.* 28:7050-7065.
- Mais, C., J. E. Wright, J. L. Prieto, S. L. Raggett, and B. McStay. 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev.* 19:50-64.
- Mason, S. W., M. Wallisch, and I. Grummt. 1997. RNA polymerase I transcription termination: similar mechanisms are employed by yeast and mammals. *J Mol Biol.* 268:229-234.
- Meier, U. T. 2005. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma.* 114:1-14.
- Menne, T. F., B. Goyenechea, N. Sanchez-Puig, C. C. Wong, L. M. Tonkin, P. J. Ancliff, R. L. Brost, M. Costanzo, C. Boone, and A. J. Warren. 2007. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet.* 39:486-495.
- Meroueh, M., P. J. Grohar, J. Qiu, J. J. SantaLucia, S. A. Scaringe, and C. S. Chow. 2000. Unique structural and stabilizing roles for the individual pseudouridine residues in the 1920 region of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 28:2075-2083.
- Miller, O. L. J., and B. R. Beatty. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science.* 164:955-957.

- Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, and D. Tollervey. 1997. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*. 91:457-466.
- Mitchell, P., E. Petfalski, and D. Tollervey. 1996. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev*. 10:502-513.
- Miyoshi, M., T. Okajima, T. Matsuda, M. N. Fukuda, and D. Nadano. 2007. Bystin in human cancer cells: intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem J*. 404:373-381.
- Mosgoeller, W., C. Schofer, M. Steiner, J. E. Sylvester, and P. Hozak. 2001. Arrangement of ribosomal genes in nucleolar domains revealed by detection of "Christmas tree" components. *Histochem Cell Biol*. 116:495-505.
- Mougey, E. B., M. O'Reilly, Y. Osheim, O. L. J. Miller, A. Beyer, and B. Sollner-Webb. 1993. The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev*. 7:1609-1619.
- Moy, T. I., and P. A. Silver. 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev*. 13:2118-2133.
- Murano, K., M. Okuwaki, M. Hisaoka, and K. Nagata. 2008. Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol*. 28:3114-3126.
- Muth, V., S. Nadaud, I. Grummt, and R. Voit. 2001. Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *EMBO J*. 20:1353-1362.
- Nissan, T. A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J*. 21:5539-5547.
- O'Mahony, D. J., and L. I. Rothblum. 1991. Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:3180-3184.
- Ochs, R. L., M. A. Lischwe, E. Shen, R. E. Carroll, and H. Busch. 1985. Nucleologenesi: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*. 92:330-336.
- Oeffinger, M., M. Dlakic, and D. Tollervey. 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev*. 18:196-209.

- Ofengand, J. 2002. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 514:17-25.
- Okuda, M., H. F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A. G. Smulian, P. K. Chan, E. S. Knudsen, I. A. Hofmann, J. D. Snyder, K. E. Bove, and K. Fukasawa. 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell.* 103:127-140.
- Okuwaki, M., K. Matsumoto, M. Tsujimoto, and K. Nagata. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett.* 506:272-276.
- Olson, M. O. 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE.* 2004:pe10.
- Orelia, C., P. Verkuijden, J. Geissler, T. K. van den Berg, and T. W. Kuijpers. 2009. SBDS expression and localization at the mitotic spindle in human myeloid progenitors. *PLoS One.* 4:e7084.
- Osheim, Y. N., S. L. French, K. M. Keck, E. A. Champion, K. Spasov, F. Dragon, S. J. Baserga, and A. L. Beyer. 2004. Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 16:943-954.
- Panov, K. I., T. B. Panova, O. Gadai, K. Nishiyama, T. Saito, J. Russell, and J. C. Zomerdiik. 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.
- Pellagatti, A., E. Hellström-Lindberg, A. Giagounidis, J. Perry, L. Malcovati, M. G. Della Porta, M. Jädersten, S. Killick, C. Fidler, M. Cazzola, J. S. Wainscoat, and J. Boulwood. 2008. Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br J Haematol.* 142:57-64.
- Pelletier, G., V. Y. Stefanovsky, M. Faubladiet, I. Hirschler-Laszkiwicz, J. Savard, L. I. Rothblum, J. Cote, and T. Moss. 2000. Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol Cell.* 6:1059-1066.
- Pfleiderer, C., A. Smid, I. Bartsch, and I. Grummt. 1990. An undecamer DNA sequence directs termination of human ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 18:4727-4736.
- Pinol-Roma, S. 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Nucleic Acids Res.* 10:77-90.
- Posnick, J. C., and R. L. Ruiz. 2000. Treacher Collins syndrome: current evaluation, treatment, and future directions. *Cleft Palate Craniofac J.* 37:434.

- Puvion-Dutilleul, F., S. Mazan, M. Nicoloso, M. E. Christensen, and J. P. Bachellerie. 1991. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur J Cell Biol.* 56:178-186.
- Raska, I. 2004. Searching for active ribosomal genes. *Prog Mol Subcell Biol.* 35:23-56.
- Raska, I., P. J. Shaw, and D. Cmarko. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol.* 18:325-334.
- Rattner, J. B., and T. Wang. 1992. Kinetochore formation and behaviour following premature chromosome condensation. *J Cell Sci.* 103:1039-1045.
- Reeder, R. H. 1999. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 62:293-327.
- Reichow, S. L., T. Hamma, A. R. Ferre-D'Amare, and G. Varani. 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 35:1452-1464.
- Robledo, S., R. Idol, D. Crimmins, J. Ladenson, P. Mason, and M. Bessler. 2008. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA.* 13.
- Rohrmoser, M., M. Holzels, T. Grimm, A. Malamoussi, T. Harasim, M. Orban, I. Pfisterer, A. Gruber-Eber, E. Kremmer, and D. Eick. 2007. Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol.* 27:3682-3694.
- Romanova, L. G., M. Anger, O. V. Zatschina, and R. M. Schultz. 2006. Implication of nucleolar protein SURF6 in ribosome biogenesis and preimplantation mouse development. *Biol Reprod.* 75:690-696.
- Rouquette, J., V. Choismel, and P. E. Gleizes. 2005. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J.* 24:2862-2872.
- Roussel, P., C. Andre, L. Comai, and D. Hernandez-Verdun. 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol.* 133:235-246.
- Roussel, P., C. Andre, C. Masson, G. Geraud, and D. Hernandez-Verdun. 1993. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci.* 104:327-337.

- Rudt, F., and T. Pieler. 1996. Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.* 15:1383-1391.
- Ruggero, D., S. Grisendi, F. Piazza, E. Rego, F. Mari, P. H. Rao, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi. 2003. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science.* 299:259-262.
- Rujkijyanont, P., S. L. Adams, J. Beyene, and Y. Dror. 2009. Bone marrow cells from patients with Shwachman-Diamond syndrome abnormally express genes involved in ribosome biogenesis and RNA processing. *Br J Haematol.* 145:806-815.
- Saez-Vasquez, J., D. Caparros-Ruiz, F. Barneche, and M. Echeverria. 2004. A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol.* 24:7284-7297.
- Sakai, D., and P. A. Trainor. 2009. Treacher Collins syndrome: unmasking the role of Tcof1/treacle. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:1229-1232.
- Savage, S. A., and B. P. Alter. 2008. The role of telomere biology in bone marrow failure and other disorders. *Mech Ageing Dev.* 129:35-47.
- Savino, R., and S. A. Gerbi. 1990. In vivo disruption of Xenopus U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 9:2299-2308.
- Savino, T. M., R. Bastos, E. Jansen, and D. Hernandez-Verdun. 1999. The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J Cell Sci.* 112:1889-1900.
- Savino, T. M., J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J. B. Sibarita, and D. Hernandez-Verdun. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol.* 153:1097-1110.
- Savkur, R. S., and M. O. Olson. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 26:4508-4515.
- Schäfer, T., B. Maco, E. Petfalski, D. Tollervay, B. Böttcher, U. Aebi, and E. Hurt. 2006. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature.* 441:651-655.

- Schäfer, T., D. Strauss, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2003. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* 22:1370-1380.
- Scheer, U., and K. M. Rose. 1984. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:1431-1435.
- Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J. C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser, and J. J. Diaz. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.* 13:4100-4109.
- Schilders, G., R. Raijmakers, J. M. Raats, and G. J. Pruijn. 2005. MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res.* 33:6795-6804.
- Schilders, G., E. van Dijk, and G. J. Pruijn. 2007. C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/ScI-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* 35:2564-2572.
- Schnapp, A., and I. Grummt. 1991. Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I. *J Biol Chem.* 266:24588-24595.
- Schofer, C., K. Weipoltshammer, M. Almeder, M. Muller, and F. Wachtler. 1996. Redistribution of ribosomal DNA after blocking of transcription induced by actinomycin D. *Chromosome Res.* 4:384-391.
- Schroth, G. P., J. S. Siino, C. A. Cooney, J. P. Th'ng, P. S. Ho, and E. M. Bradbury. 1992. Intrinsically bent DNA flanks both sides of an RNA polymerase I transcription start site. Both regions display novel electrophoretic mobility. *J Biol Chem.* 267:9958-9964.
- Senger, B., D. L. Lafontaine, J. S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J. M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt, and F. Fasiolo. 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell.* 8:1363-1373.
- Shaw, P. J., M. I. Highett, A. F. Beven, and E. G. Jordan. 1995. The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J.* 14:2896-2906.
- Shi, L. J., Z. M. Ni, S. Zhao, G. Wang, and Y. Yang. 1987. Involvement of a nucleolar component, perichromonucleolin, in the condensation and decondensation of chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7953-7956.

- Shou, W., K. M. Sakamoto, J. Keener, K. W. Morimoto, E. E. Traverso, R. Azzam, G. J. Hoppe, R. M. Feldman, J. DeModena, D. Moazed, H. Charbonneau, M. Nomura, and R. J. Deshaies. 2001. Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol Cell*. 8:45-55.
- Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, A. Shevchenko, H. Charbonneau, and R. J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*. 97:233-244.
- Sirri, V., D. Hernandez-Verdun, and P. Roussel. 2002. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol*. 156:969-981.
- Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun. 1999. The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci*. 112:3259-3268.
- Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun. 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.
- Skarie, J. M., and B. A. Link. 2008. The primary open-angle glaucoma gene WDR36 functions in ribosomal-RNA processing and interacts with the p53 stress-response pathway. *Hum Mol Genet*. .
- Soudet, J., J. P. Gelugne, K. Belhabich-Baumas, M. Caizergues-Ferrer, and A. Mouglin. 2010. Immature small ribosomal subunits can engage in translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 29:80-92.
- Srivastava, L., Y. R. Lapik, M. Wang, and D. G. Pestov. 2010. Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. *Mol Cell Biol*. 30:2947-2956.
- Stefanovsky, V. Y., G. Pelletier, D. P. Bazett-Jones, C. Crane-Robinson, and T. Moss. 2001. DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res*. 29:3241-3247.
- Stewart, M. J., and E. K. Nordquist. 2005. *Drosophila* Bys is nuclear and shows dynamic tissue-specific expression during development. *Dev Genes Evol*. 215:97-102.

- Strezoska, Z., D. G. Pestov, and L. F. Lau. 2000. Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5.8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 20:5516-5528.
- Strezoska, Z., D. G. Pestov, and L. F. Lau. 2002. Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J Biol Chem.* 277:29617-29625.
- Suzuki, N., J. Nakayama, I. M. Shih, D. Aoki, S. Nozawa, and M. N. Fukuda. 1999. Expression of trophinin, tustin, and bystin by trophoblast and endometrial cells in human placenta. *Biol Reprod.* 60:621-627.
- Suzuki, N., J. Zara, T. Sato, E. Ong, N. Bakhiet, R. G. Oshima, K. L. Watson, and M. N. Fukuda. 1998. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tustin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:5027-5032.
- Sweet, T., W. Yen, K. Khalili, and S. Amini. 2008. Evidence for involvement of NFBP in processing of ribosomal RNA. *J Cell Physiol.* 214:381-388.
- Takahashi, N., M. Yanagida, S. Fujiyama, T. Hayano, and T. Isobe. 2003. Proteomic snapshot analyses of preribosomal ribonucleoprotein complexes formed at various stages of ribosome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Mass Spectrom Rev.* 22:287-317.
- Thiry, M., T. Cheutin, F. Lamaye, N. Thelen, U. T. Meier, M. F. O'Donohue, and D. Ploton. 2009. Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis. *Histochem Cell Biol.* 132:129-140.
- Thiry, M., T. Cheutin, M. F. O'Donohue, H. Kaplan, and D. Ploton. 2000. Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA.* 6:1750-1761.
- Thiry, M., and D. L. Lafontaine. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15:194-199.
- Thomas, F., and U. Kutay. 2003. Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci.* 116:2409-2419.

- Tiollais, P., F. Galibert, and M. Boiron. 1971. Evidence for the existence of several molecular species in the "45S fraction" of mammalian ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68:1117-1120.
- Trotta, C. R., E. Lund, L. Kahan, A. W. Johnson, and J. E. Dahlberg. 2003. Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J*. 22:2841-2851.
- Turner, A. J., A. A. Knox, J. L. Prieto, B. McStay, and N. J. Watkins. 2009. A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol Cell Biol*. 29:3007-3017.
- Tycowski, K. T., M. D. Shu, and J. A. Steitz. 1994. Requirement for intron-encoded U22 small nucleolar RNA in 18S ribosomal RNA maturation. *Science*. 266:1558-1561.
- Valdez, B. C., D. Henning, R. B. So, J. Dixon, and M. J. Dixon. 2004. The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10709-10714.
- Vanrobays, E., J. P. Gelugne, P. E. Gleizes, and M. Caizergues-Ferrer. 2003. Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 23:2083-2095.
- Verheggen, C., J. Mouaikel, M. Thiry, J. M. Blanchard, D. Tollervey, R. Bordonne, D. L. Lafontaine, and E. Bertrand. 2001. Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J*. 20:5480-5490.
- Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*. 2:709-718.
- Visintin, R., E. S. Hwang, and A. Amon. 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature*. 398:818-823.
- Voit, R., and I. Grummt. 2001. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13631-13636.
- Voit, R., M. Hoffmann, and I. Grummt. 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J*. 18:1891-1899.

- Vollmer, M., P. Horth, G. Rozing, Y. Coute, R. Grimm, D. Hochstrasser, and J. C. Sanchez. 2006. Multi-dimensional HPLC/MS of the nucleolar proteome using HPLC-chip/MS. *J Sep Sci.* 29:499-509.
- Vulliamy, T. J., S. W. Knight, P. J. Mason, and I. Dokal. 2001. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis.* 27:353-357.
- Wang, Y., J. Liu, H. Zhao, W. Lu, J. Zhao, L. Yang, N. Li, X. Du, and Y. Ke. 2007. Human 1A6/DRIM, the homolog of yeast Utp20, functions in the 18S rRNA processing. *Biochim Biophys Acta.* 1773:863-868.
- Wanzel, M., A. C. Russ, D. Kleine-Kohlbrecher, E. Colombo, P. G. Pelicci, and M. Eilers. 2008. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat Cell Biol.*
- Watkins, N. J., A. Dickmanns, and R. Luhrmann. 2002. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol.* 22:8342-8352.
- Weisenberger, D., and U. Scheer. 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol.* 129:561-575.
- Welting, T. J., W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn. 2004. Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* 32:2138-2146.
- Woolford, J. L. J. 1991. The structure and biogenesis of yeast ribosomes. *Adv Genet.* 29:63-118.
- Yanagida, M., A. Shimamoto, K. Nishikawa, Y. Furuichi, T. Isobe, and N. Takahashi. 2001. Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. *Proteomics.* 1:1390-1404.
- Zatsepina, O. V., R. Voit, I. Grummt, H. Spring, M. V. Semenov, and M. F. Trendelenburg. 1993. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma.* 102:599-611.
- Zemp, I., T. Wild, M. O'donohue, F. Wandrey, B. Widmann, P. Gleizes, and U. Kutay. 2009. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *The Journal of Cell Biology.* 185:1167-1180.

- Zhang, J., Y. Yang, and J. Wu. 2009. B23 interacts with PES1 and is involved in nucleolar localization of PES1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 41:991-997.
- Zhang, Y., G. W. Wolf, K. Bhat, A. Jin, T. Allio, W. A. Burkhardt, and Y. Xiong. 2003. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*. 23:8902-8912.
- Zomerdijk, J. C., H. Beckmann, L. Comai, and R. Tjian. 1994. Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science*. 266:2015-2018.

RÉSUMÉ

Principalement étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la biogenèse des ribosomes est un processus ubiquitaire encore peu décrit chez les mammifères. Les études menées ces dernières années dans ces organismes ont décrit de nouvelles étapes de maturation des ARNr au sein des métazoaires. Les différences dans les étapes de ce processus entre homme et levure ainsi que le nombre croissant de maladies liées à des défauts de biogenèse des ribosomes soulèvent l'intérêt de l'étude de ces mécanismes dans des organismes pluricellulaires, en particulier chez l'homme.

Le but de ma thèse consistait à préciser les étapes de la maturation et de l'assemblage de petite sous-unité ribosomique, dont la production est plus simple que celle de la grande sous-unité. Pour cela, je me suis intéressée à deux orthologues humains de facteurs pré-ribosomiques de *S. cerevisiae*, Enp1p et Tsr1p, intervenant à des étapes distinctes, i.e. précoce et nucléaire pour Enp1p, et tardive et cytoplasmique pour Tsr1p. Les résultats obtenus ont montré la conservation de ces protéines en tant que facteurs pré-ribosomiques requis pour la maturation de la petite sous-unité chez l'homme. Nous avons ainsi décrit une nouvelle étape de maturation de l'ARNr 18S dans les cellules humaines, le pré-ARNr 21S-C, ainsi qu'un couplage export-maturation de la particule pré-40S spécifique à l'homme.

Lors de la perte d'expression de la bystine et de certaines protéines ribosomiques, nous avons observé de manière inattendue un défaut de résorption des corps pré-nucléolaires en sortie de mitose. Les corps pré-nucléolaires (ou PNBs) sont des structures transitoires, décrites jusque là comme des plates-formes d'assemblage pour la reformation des nucléoles. Nos résultats mettent en évidence pour la première fois que la maturation des ribosomes reprend au sein même des PNBs. Ceci nous amène à proposer que ce soit ce mécanisme qui oriente la résorption ordonnée et progressive des PNBs en début de phase G1. De manière intéressante, la perte d'expression de certaines protéines ribosomiques impliquées dans la DBA entraîne des défauts de résorption des PNBs ainsi qu'un délai dans la progression en phase G1, ce qui soulève la question de la conséquence des défauts de la réorganisation post-mitotique du noyau dans les mécanismes physiopathologiques.

L'ensemble de ces résultats mettent donc en exergue des spécificités de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères et précisent une partie des mécanismes mis en œuvre lors de la nucléogenèse post-mitotique. Ils ouvrent ainsi un nouvel axe de recherche pour explorer des liens entre des défauts de biogenèse des ribosomes et le développement de pathologies.