

UNIVERSITE DE LIEGE

Faculté des Sciences

**Laboratoire de biologie cellulaire et tissulaire
Professeur G. Goessens**

ESSAI SUR LE *NUCLEOLE*

Marc THIRY

Chercheur qualifié F. N. R. S.

**Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade d'agrégé de
l'enseignement supérieur**

Année académique 2001-2002

Avertissement

Cette dissertation est proposée dans le cadre de l'examen d'agrégé de l'enseignement supérieur. De conception inhabituelle, nous avons choisi volontairement de la rédiger sous forme d'un condensé auquel nous joignons nos publications les plus significatives sur le sujet traité.

Notre analyse du nucléole des noyaux des cellules eucaryotes a débuté en 1984, lors de la préparation de notre mémoire de licence en sciences zoologiques dans le service de biologie cellulaire et tissulaire du Professeur Goessens. Elle a donné matière à une thèse de doctorat en 1989, puis s'est poursuivie au sein du même service et sur le même thème jusqu'à ce jour.

L'objectif de ce manuscrit est de dresser un aperçu global des conclusions tirées de notre travail durant cette dernière période. Dans chaque chapitre, nous présentons une synthèse épurée de nos résultats originaux, ceux-ci ayant été, avec matériel et méthodes, exposés et discutés au fur et à mesure de leur obtention dans différents journaux scientifiques.

Les questions qui ne trouveraient pas une réponse ponctuelle satisfaisante dans ce mémoire sont renvoyées aux articles y annexés.

Certaines données, n'ayant pas fait l'objet de publications, sont accompagnées d'informations détaillées, soit dans les légendes des figures les illustrant, soit dans les pages les mentionnant.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION

1. 1. Les gènes ribosomiques	p.
1. 2. La transcription des gènes ribosomiques	p.
1. 3. La maturation de l'ARN ribosomique	p.
1. 3. 1. Les modifications de nucléotides	p.
1. 3. 2. Les clivages	p.
1. 4. L'assemblage des préribosomes	p.
1. 4. 1. L'ARN ribosomique 5S	p.
1. 4. 2. Les protéines ribosomiques et non ribosomiques	p.
1. 5. La structure nucléolaire	p.

2. RECHERCHES PERSONNELLES

2. 1. Le nucléole dans les noyaux des cellules de Mammifères	p.
2. 1. 1. Localisation de l'ADN par la méthode d'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique	p.
2. 1. 2. Localisation ultrastructurale des régions actives de la chromatine associée au nucléole	p.
2. 1. 3. Localisation ultrastructurale de régions intercalaires des gènes ribosomiques par hybridation <i>in situ</i>	p.
2..1. 4. Devenir de l'ADN associé au nucléole après une inhibition de la transcription des gènes ribosomiques	p.
2. 1. 5. Détection ultrastructurale de l'ARN et de l'ARN ribosomique dans le nucléole par des méthodes immunocytologiques et d'hybridation <i>in situ</i>	p.
2. 1. 6. Localisation des ARN naissants dans le nucléole par immunocytologie ultrastructurale	p.
2. 1. 7. Localisation ultrastructurale d'une protéine associée à	

l'ARN polymérase I	p.
2. 1. 8. Discussion partielle	p.
2. 2. Le nucléole dans le noyau d'autres cellules eucaryotes	p.
2. 2. 1. Le nucléole dans les noyaux des cellules animales, non mammaliennes	p.
2. 2. 2. Le nucléole dans les noyaux des cellules végétales	p.
2. 2. 3. Le nucléole dans le noyau de la Levure	p.
2. 2. 4. Discussion partielle	p.
3. CONSIDERATIONS GENERALES	p.
4. PERSPECTIVES	p.
5. BIBLIOGRAPHIE	p.
5. 1. Liste des publications personnelles	p.
5. 2. Références	p.
Abréviations, sigles et acronymes	p.

1. INTRODUCTION

Chez les Eucaryotes, les gènes ribosomiques sont présents dans toutes les cellules, regroupés en des lieux précis. Redondants, ils sont d'autant plus facilement accessibles. Actifs, ils se structurent en cet organite nucléaire essentiel à la cellule : le nucléole.

L'intérêt apporté à la connaissance de ces éléments composites a imprimé un essor formidable à leur étude. Leur analyse, de préférence à d'autres gènes, a été approfondie dans les différentes disciplines de la biologie.

1. 1. Les gènes ribosomiques

Dans le génome, les gènes ribosomiques sont groupés dans des régions caractéristiques de certains chromosomes, appelées constrictions secondaires ou organisateurs nucléolaires (NOR). Chez l'Homme, par exemple, les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 portent les NOR. Par génome haploïde, les copies des gènes ribosomiques sont répétées plusieurs centaines de fois chez les Animaux et plusieurs milliers de fois chez les Plantes (Hadjiolov, 1985).

Dans d'autres organismes, les gènes ribosomiques du génome s'amplifient et les copies produites peuvent créer des nucléoles extrachromosomiques dès activation transcriptionnelle. C'est le cas durant la méiose chez les Amphibiens (formation d'anneaux épisomiaux d'environ dix copies) et chez les Insectes, ou pendant la croissance somatique des Myxomycètes et des Protozoaires (Brown and Dawid, 1968 ; Gall, 1969 ; MacGregor, 1982 ; Hadjiolov, 1985).

Grâce à la mise au point par Miller et Beatty (1969) d'une technique d'étalement moléculaire de la chromatine, l'organisation des gènes ribosomiques de plusieurs organismes a pu être visualisée au microscope électronique.

Les gènes ribosomiques sont en général organisés en unités répétitives disposées en tandems (Long and Dawid, 1980 ; Hadjiolov, 1985). Sur chaque gène, une région à transcrire communément appelée unité de transcription (où se suivent un intercalaire externe 5', la séquence à l'origine de l'ARN ribosomique 18S, un intercalaire interne 1, la séquence à l'origine de l'ARN ribosomique 5,8S, un intercalaire interne 2, la séquence à l'origine de l'ARN ribosomique 28S et un intercalaire externe 3') est séparée de la suivante par un élément intermédiaire nommé intercalaire intergénique (figure 1). La longueur des unités répétitives varie d'un organisme à l'autre (44 kb chez les Mammifères et 9,1 kb chez la Levure). Ces différences découlent de modifications existant tant dans les séquences intercalaires de l'unité de transcription, que, de façon plus sensible encore, dans l'intercalaire intergénique (2kb chez *Saccharomyces cerevisiae*, 21kb chez des Mammifères). Ces variations se constatent non seulement entre les espèces mais également au sein d'un même génome. Quant aux séquences à transcrire pour donner les ARN ribosomiques 18S, 5,8S et 28S, elles sont hautement conservées au cours de l'évolution (Moss and Stefanovsky, 1995).

Chez les Eucaryotes, une zone de l'intercalaire intergénique est primordiale (Moss and Stefanovsky, 1995 ; Grummt, 1999). Son agencement global est généralement bien conservé, quoique la séquence en nucléotides à son niveau ne soit pas toujours identique. Cette région contient des segments (particulièrement deux d'entre eux) essentiels à la régulation de la transcription des gènes ribosomiques.

Le premier, le "core promotor", est l'unique élément indispensable au départ fidèle de la transcription. Il s'étend de la position -40 à +10, comporte une région riche de quatre à six

paires de bases AT au site de mise en route et, légèrement en amont, une zone où se lient les facteurs de transcription (figure 1).

Le second, l' "upstream core element", correspond à une région proche de la position -150 (figure 1). Non indispensable, cette zone est toutefois reconnue stimuler fortement la transcription *in vivo* et capable de se lier aux mêmes facteurs que le "core promotor" si elle est bien positionnée vis-à-vis de ce dernier.

Sont également identifiés à ce niveau les promoteurs de l'intercalaire, les éléments de terminaison du promoteur de l'intercalaire, les "enhancers" répétitifs et non répétitifs, mais aussi des séquences servant à la réplication ou à la recombinaison de l'ADN. Toutes ces séquences diffèrent très fortement d'une espèce à l'autre (figure 1). En fait, le rôle de certains de ces éléments, situés en amont, consisteraient à stimuler l'activité du promoteur, à stabiliser les complexes de mise en route et à multiplier le nombre de gènes transcriptionnellement actifs (Osheim et al., 1996).

1. 2. La transcription des gènes ribosomiques

Chez les Eucaryotes, la transcription des gènes ribosomiques est régie par l'ARN polymérase I dont c'est le rôle exclusif (Grummt, 1999 ; Reeder, 1999).

Cette enzyme, d'un poids moléculaire de 500 kD, est constituée de deux grandes sous-unités polypeptidiques et de petites sous-unités polypeptidiques (3 à 14, ce nombre dépendant du procédé de purification employé). Sous sa forme active, elle est phosphorylée par la caséine kinase II.

Dès le début de son action, elle requiert la participation de facteurs protéiques nécessaires au déclenchement constant du phénomène de transcription. Il en existe quatre : TIF-IA, TIF-IB, TIF-IC et UBF (figure 2).

Leur collaboration se modélise selon deux schémas (figure 3). La possibilité la plus fréquemment admise est la formation d'un premier complexe résultant de la liaison des facteurs TIF-IB et UBF au promoteur de l'ADN ribosomique ; cette étape serait suivie de l'association de l'ARN polymérase I et du complexe d'ARN polymérase I et facteurs TIF-IA et TIF-IC, attirés *via* des liaisons entre protéines, avec le premier complexe formé. Seul le complexe final devient compétent. Une autre éventualité serait fondée sur un assemblage préalable des quatre facteurs de transcription avec l'ARN polymérase I avant leur réunion avec le promoteur de l'ADN ribosomique.

L'ARN polymérase I s'allie également à la topoisomérase I qui est capable de supprimer les tours superhélicoïdaux de l'ADN (Shykind et al., 1997 ; Stewart et al., 1998).

Sur étalement moléculaire de la chromatine de cellules provenant de différents organismes (Miller and Beatty, 1969 ; Mc Knight and Miller, 1976 ; Reeder et al., 1976 ; Foe, 1978 ; Franke et al., 1979 ; Puvion-Dutilleul, 1983), les molécules d'ARN polymérase I apparaissent, sous forme de granules de 12 à 14 nm accolés les uns aux autres, recouvrant entièrement l'unité de transcription (quarante à cinquante molécules d'ARN polymérase I par μm d'axe d'ADN ribosomique) ; le sens de la transcription est donné par l'allongement des ARN ribosomiques naissant le long de l'axe d'ADN ribosomique au rythme de vingt à quarante nucléotides à la seconde.

La transcription se termine au niveau des séquences de terminaison présentes en aval de la région à l'origine de l'ARN ribosomique 28S. La pause de l'ARN polymérase I, les largages du préARN ribosomique et de l'ARN polymérase I ainsi que le clivage de l'extrémité 3' de l'ARN primaire transcrit sont des opérations qui nécessitent des protéines spécifiques (figure 4) ; le mécanisme d'intervention de ces protéines est cependant mal connu (Grummt, 1999 ; Reeder, 1999).

Une fois transcrit, le gène ribosomique produit un ARN ribosomique primaire allant de 37 à 47 S suivant les espèces et dont la topologie est présentée dans la figure 5.

1. 3. La maturation de l'ARN ribosomique

Le phénomène de la maturation ribonucléique est extrêmement compliqué. Il dépend de multiples agents intervenant au cours de deux types majeurs d'événements : les modifications de nucléotides et les opérations de clivage.

1. 3. 1. Les modifications des nucléotides

Les modifications des nucléotides s'effectuent tandis que les préARN ribosomiques s'allongent. Au nombre de trois, elles se réalisent à des positions bien précises et correspondent à des éléments conservés de la structure secondaire. La méthylation de l'hydroxyle du carbone 2' du ribose concerne cent à cent quatre nucléotides ; la transformation en pseudo-uridine a trait à nonante-cinq uridines ; la méthylation touche neuf bases. Ces modifications auraient une responsabilité dans la structure tertiaire fine des ARN ribosomiques et dans l'assemblage des particules préribosomiques. Par ailleurs, certains auteurs leur attribuent un rôle dans la fonction des ribosomes.

La méthylation du ribose fait appel à une classe de petits ARN nucléolaires antisens (à raison de dix à vingt et un nucléotides complémentaires) qui guident jusqu'aux sites de méthylation. De structure en tige (figure 6), leur extrémité 5' porte une boîte C et leur 3' une boîte D. La boîte C est une séquence présente dans de nombreux petits ARN nucléolaires permettant de reconnaître la fibrillarine, supputée être la méthyltransférase idéale de l'ARN ribosomique (Ro-Choi, 1997 ; Bachellerie and Cavaille, 1997).

La modification d'uridine en pseudo-uridine fait appel à une autre famille particulière de petits ARN. Ces derniers sont organisés en un ensemble typique (figure 6) de deux épingles à cheveux alternant avec une boîte H et une boîte ACA dont la préservation de l'intégrité est cruciale pour l'exécution de la modification. Ils ne possèdent pas de séquences antisens pour les sites à reconnaître, seule la structure secondaire les oriente (Ro-Choi, 1997). La présence de la protéine Cbf5p, identifiée chez la Levure, témoigne d'une synthèse active de pseudo-uridine (Cadwell et al., 1997 ; Lafontaine et al., 1998). Cette dernière montre septante-neuf pour cent d'homologie avec une protéine NAP57, connue pour son association avec la phosphoprotéine nucléolaire, Nopp140, chez les Eucaryotes supérieurs (Meier and Blobel, 1994).

1. 3. 2. Les clivages

Sitôt la transcription terminée et l'ARN primaire libéré de l'ADN ribosomique, un enchaînement de clivages de l'ARN naissant s'organise pour éliminer toutes les séquences intercalaires internes et externes transcrites, et aboutir à la formation des ARN ribosomiques 18S, 5,8S et 28S (Hadjiolov, 1985 ; Venema and Tollervey, 1995).

Etudié dans différents organismes tels *Tetrahymena*, *Xenopus*, la Souris et l'Homme, c'est chez la Levure que ce processus est le mieux défini (figure 5). Selon un programme savamment orchestré, un ensemble d'endonucléases et d'exonucléases, dont certaines sont caractérisées (Elela et al., 1996 ; Kressler et al., 1999 ; Venema et Tollervey, 1999 ; Allmang et al., 2000), clivent successivement les précurseurs des ARN ribosomiques. La part prise à ces cassures par des petits ARN, dont l'ARN U3 est le plus connu, reste floue (Gerbi, 1995 ; Smith and Steitz, 1997 ; Peculis, 2000). Il est certain qu'ils s'associent avec des protéines pour former des petits complexes mais pas obligatoirement aux endroits des clivages. La fibrillarine (Tyc and Steitz,

1989 ; Aris and Blobel, 1991 ; Tollervey et al., 1993), par exemple, est une protéine entrant dans la composition de plusieurs de ces complexes. Les facteurs déjà impliqués dans les premières étapes des clivages ont été localisés dans les petites structures sphériques qui s'observent aux extrémités des branches des "arbres de Noël" après étalement moléculaire de la chromatine (Mougey et al., 1993).

1. 4. L'assemblage des préribosomes

Dans les ribosomes, à côté des ARN ribosomiques 18S, 5,8S et 28S, se rencontrent l'ARN 5S, des protéines ribosomiques et des protéines non ribosomiques.

1. 4. 1. L'ARN ribosomique 5S

De provenance extranucléolaire dans la majorité des cellules eucaryotes, la synthèse de l'ARN 5S suit une autre filière que les ARN ribosomiques issus du nucléole (figure 7).

Dans les cellules somatiques, le nombre de gènes générant l'ARN 5S est plus élevé que celui qui donnera les ARN 18S, 5,8S et 28S, quoique certains Eucaryotes inférieurs possèdent le même nombre de gènes à la source des quatre ARN ribosomiques et que les séquences concernées soient sur la même unité répétitive. Toutefois, les fragments qui donneront naissance aux quatre ARN ribosomiques sont transcrits séparément par les ARN polymérases spécifiques : l'ADN 5S par l'ARN polymérase III, les ADN 18S, 5,8S et 28S par l'ARN polymérase I (Warner, 1989).

Lors de la transcription du gène 5S par l'ARN polymérase III, l'ARN 5S primaire se lie à la protéine La, intervenante de la fin de la transcription, puis à la protéine ribosomique L5 avant d'être incorporé dans la grosse sous-unité des ribosomes (Steitz et al., 1988 ; Guddat et al., 1990 ; Yoo and Wolin, 1994).

L'ovocyte de Xénope est un cas particulier ; à son niveau, l'ARN 5S est momentanément stocké dans le cytoplasme avant de s'y associer avec la protéine ribosomique L5 et réintégrer le noyau (Rudt and Pieler, 1996). Habituellement, l'ARN 5S, utile au clivage de l'ARN 27S, reste cantonné au nucléoplasme (Dechampsme et al.1999).

1. 4. 2. Les protéines ribosomiques et non ribosomiques

Le premier ARN ribosomique qui se libère de l'ADN ribosomique transcrit est déjà à ce stade spécifiquement couplé à des protéines ribosomiques et non ribosomiques et qualifié de préribosome (Chooi and Leiby, 1981 ; Olson, 1990).

Trois types de préribosomes sont connus (Hadjiolov, 1985) : les particules de 80S, 55 S et 40S (figure 7). Celles de 80S constituent entre dix et vingt pour cent de la population nucléolaire ; elles renferment l'ARN primaire, la moitié des protéines de la grosse sous-unité des ribosomes et le tiers de leur petite sous-unité. Les particules de 55S représentent septante à quatre-vingts pour cent des préribosomes nucléolaires. Elles contiennent les ARN ribosomiques 32S, 5S et les mêmes protéines de la grosse sous-unité des ribosomes que celles rencontrées dans les particules de 80S. La faible quantité nucléolaire de particules de 40S est composée essentiellement d'ARN ribosomique 20S et des protéines de la petite sous-unité des ribosomes, identiques à celles présentes dans les particules de 80S. Les protéines des deux sous-unités ribosomiques s'ajoutent plus volontiers lors du passage des particules de 55S et 40S vers le cytoplasme, voire même ne s'additionnent qu'une fois arrivées dans le cytoplasme.

A côté de ces protéines de structure, d'autres protéines s'associent aux préribosomes mais ne se retrouvent pas dans le ribosome mature. Quelques-unes impliquées dans la

biogénèse des ribosomes ont été décrites (Olson, 1990 ; Olson et al., 2000). C'est le cas de la nucléoline ; très abondante, elle jouerait un rôle dans les mécanismes de maturation des ARN ribosomiques et dans l'assemblage des préribosomes (Ginisty et al., 1998, 1999).

1. 5. La structure nucléolaire

Au microscope électronique (figure 8), le nucléole des noyaux des cellules se différencie en cinq compartiments distincts par leur texture, leur densité aux électrons et leur agencement spatial (Busch and Smetana, 1970 ; Goessens, 1984 ; Hernandez-Verdun, 1986 ; Shaw and Jordan, 1995 ; Scheer and Hock, 1999).

Une structure fibrillaire plus ou moins circulaire, peu dense aux électrons et appelée centre fibrillaire est entourée de fibrilles serrées, disposées en cordons denses aux électrons et dénommées composant fibrillaire dense. Le constituant granulaire est formé d'un réseau de granules environnant les parties fibrillaires. Les interstices nucléolaires sont des espaces de dimension et d'aspect variables ; ils sont très peu contrastés électroniquement et occupent des positions aléatoires dans le nucléole. Le dernier constituant est la chromatine condensée associée au nucléole ; elle est observée sous forme d'amas plus ou moins importants au sein ou au dehors des autres composants.

Un nucléole est typique du noyau d'un modèle cellulaire déterminé et reflète volontiers dans sa forme l'état physiologique de la cellule qu'il occupe.

Trois grands types de nucléoles ont été décrits. Les nucléoles, dits "compacts", voient leurs compartiments nettement individualisés former un tout dense. Les nucléoles, qualifiés de "réticulés", présentent un agencement plus lâche de leurs constituants ; ces derniers restent, toutefois, bien délimités et maintiennent les mêmes contacts entre eux, indépendamment du nombre grandissant d'interstices. Les nucléoles en "ring-shaped" se caractérisent par une répartition annelée des constituants classiques ; le centre fibrillaire est ceint par une couronne de fibrilles denses, elle-même cernée par un anneau de granules, bagué à son tour par des mottes de chromatine condensée.

Lors de l'entrée en division de la cellule, le nucléole disparaît progressivement à l'exception de deux types de composants. Un matériel fibrillaire clair reste accolé durant les différentes phases de la mitose à un ou plusieurs chromosomes et des masses granulaires demeurent, çà et là, autour des chromosomes (Goessens, 1984).

La reconstruction du nucléole se réalise autour de la partie fibrillaire persistant tout au long de la mitose, le NOR. Ce NOR est supposé être, du moins en partie, le centre fibrillaire du nucléole dans le noyau de la cellule en interphase (Goessens and Lepoint, 1974, 1979). La réédification du nucléole s'amorce, dès la réactivation du gène ribosomique, à partir de molécules synthétisées au cours du cycle précédent et dispersées dans le cytoplasme au moment de l'entrée en mitose de la cellule (de la Torre and Gimenez-Martin, 1982 ; Goessens, 1984 ; Hadjiolov, 1985).

Une autre grande modification de l'organisation nucléolaire est celle produite par l'induction d'une ségrégation suite à l'action d'une drogue. Dans ces conditions, les constituants nucléolaires se compactent et se redistribuent suivant une alternance particulière (Bernhard et al., 1965 ; Bush and Smetana, 1970 ; Simard et al., 1974 ; Daskal, 1979 ; Puvion and Moyne, 1981 ; Bouteille et al., 1982 ; Hadjiolov, 1985).

2. RECHERCHES PERSONNELLES

2. 1. Le nucléole dans les noyaux des cellules de Mammifères

Jusqu'en 1984, les études autoradiographiques désignaient le constituant fibrillaire dense du nucléole du noyau de la cellule comme le siège de la synthèse des préARN ribosomiques (Fakan, 1978 ; Goessens, 1984 ; Fakan, 1986 ; Schwarzacher and Wachtler, 1987). Cette conception devint caduque avec la localisation, exclusivement dans les centres fibrillaires des nucléoles, de l'enzyme indispensable à la transcription de l'ARN ribosomique, l'ARN polymérase I (Scheer and Rose, 1984).

Au cours de notre thèse de doctorat, nous avons développé, au niveau ultrastructural, des méthodes immunocytologiques de détection de l'ADN (Thiry, 1988b ; Thiry and Dombrowicz, 1988 ; Thiry et al., 1988a, 1988b ; Thiry and Muller, 1989 ; Derenzini et al., 1990 ; Thiry et al., 1991a) et adapté la technique d'hybridation *in situ* (Thiry and Thiry-Blaise, 1989 ; Thiry et al., 1991a). Par le biais de ces procédés, nous avons décelé de l'ADN dans les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères, essentiellement à leur bordure. Par hybridation ADN ribosomique/ADN ribosomique *in situ*, nous avons été le premier à y visualiser de l'ADN ribosomique. Mais contrairement à d'autres auteurs (Fakan and Hancock, 1974 ; Mirre and Stahl, 1978 ; Hernandez-Verdun et al., 1982 ; Raska et al., 1992 ; Raska and Dundr, 1993 ; Derenzini et al., 1993 ; Jimenez-Garcia et al., 1993 ; Mosgöller et al., 1993), nous ne mettons pas en évidence de l'ADN dans le constituant fibrillaire dense des nucléoles.

Cette divergence de résultats dynamisait à nouveau le débat sur le site de la transcription des gènes ribosomiques et nous a poussé à rassembler un maximum d'éléments déterminants pour tenter de statuer sur le litige.

2. 1. 1. Localisation de l'ADN par la méthode d'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique

L'étude de l'organisation fonctionnelle du nucléole du noyau de la cellule requiert une parfaite connaissance de la localisation exacte des gènes ribosomiques au sein de celui-ci.

Suite aux études réalisées par hybridation *in situ*, il n'existe aucun désaccord quant à la localisation d'une partie des gènes ribosomiques dans la chromatine condensée associée au nucléole (Jacob et al., 1974 ; Thiry and Thiry-Blaise, 1989 ; Schwarzacher and Wachtler, 1991 ; Puvion-Dutilleul et al., 1991a ; Stahl et al., 1991 ; Puvion-Dutilleul et al., 1992 ; Thiry and Goessens, 1992a ; Raska et al., 1995 ; Besse and Puvion-Dutilleul, 1996) ; par contre, pour l'ADN ribosomique visualisé par la même voie au sein des parties fibrillaires du nucléole, trois options coexistent : soit il est présent uniquement dans les centres fibrillaires (Thiry and Thiry-Blaise, 1989 ; Puvion-Dutilleul et al., 1991a ; Thiry et al., 1991a ; Puvion-Dutilleul et al., 1992 ; Besse and Puvion-Dutilleul, 1996), soit seulement dans le constituant fibrillaire dense (Ghosh and Paweletz, 1990 ; Wachtler et al., 1990 ; Schwarzacher and Wachtler, 1991 ; Jimenez-Garcia et al., 1993 ; Dadoune et al., 1994), soit encore dans ces deux compartiments à la fois (Stahl et al., 1991 ; Wachtler et al., 1992 ; Hozak et al., 1993 ; Raska et al., 1995). Si la présence d'ADN ribosomique dans les centres fibrillaires est en accord avec la distribution de l'ADN dans le nucléole comme observée à l'aide d'un grand nombre de méthodes (Scheer et al., 1987 ; Thiry, 1988b ; Thiry et al., 1988 ; Thiry and Muller, 1989 ; Thiry et al., 1991a), sa présence dans le constituant fibrillaire dense est plus surprenante. Des études y ont suggéré la présence d'ADN, particulièrement dans sa partie proximale entourant le centre

fibrillaire (Fakan and Hancock, 1974 ; Mirre and Stahl, 1978 ; Hernandez-Verdun et al., 1982 ; Raska et al., 1992 ; Raska and Dundr, 1993 ; Derenzini et al., 1993 ; Jimenez-Garcia et al., 1993 ; Mosgöller et al., 1993).

Les méthodes existantes de mise en évidence de l'ADN ne sont applicables que sur du matériel biologique préparé dans des conditions où la conservation de l'ultrastructure du nucléole est loin d'être optimale, les techniques autoradiographiques exceptées, mais malheureusement leur résolution n'est pas suffisamment élevée.

Afin de connaître la localisation précise de l'ADN dans des constituants nucléolaires parfaitement conservés, nous avons adapté à l'échelle ultrastructurale un procédé de la biologie moléculaire (Thiry, 1992a, 1995a, 1995b, 1999), couramment utilisé dans la préparation de sondes pour l'hybridation. Son principe est basé sur l'apparition d'extrémités d'ADN à la surface des coupes ultrafines suite à leur confection. Ces extrémités libres d'ADN peuvent être spécifiquement reconnues par la transférase des désoxynucléotides terminaux qui y ajoutent le bromodésoxyuridine triphosphate fourni. Les sites concernés sont ensuite révélés au moyen d'une méthode immunocytologique indirecte faisant appel à des anticorps antibromodésoxyuridine et des anticorps secondaires couplés à des particules d'or colloïdal (figure 9).

Nous avons choisi d'appliquer cette procédure sur des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, après fixation puis traitement par la technique d'acétylation pour deux raisons (Thiry, 1992b). Premièrement, le noyau de ce modèle cellulaire a le grand avantage de posséder des nucléoles compacts avec de grands centres fibrillaires entourés par une couronne discontinue de fibrilles denses ; deuxièmement, le procédé d'acétylation a la précieuse propriété de différencier particulièrement les trois constituants nucléolaires et d'augmenter très sensiblement le contraste de la chromatine condensée (Thiry et al., 1985 ; Thiry and Goessens, 1986). La réunion de ces conditions expérimentales favorables est possible avec le nouveau système de détection de l'ADN et améliore sans conteste la lecture de la distribution du marquage.

Dans ces circonstances, nous observons un marquage intense sur les blocs de chromatine périnucléolaire, sur leurs invaginations infiltrant le nucléole jusqu'au contact des centres fibrillaires, sur les petits amas bien visibles de chromatine condensée présents dans les interstices interrompant la couronne de fibrilles denses et sur la chromatine qui relie parfois les centres fibrillaires entre eux. Quant aux centres fibrillaires des nucléoles, ils sont marqués préférentiellement à leur pourtour, contrairement aux constituants fibrillaire dense et granulaire qui ne présentent jamais de marquage significatif, même fortuit.

Nous avons appliqué notre approche sur plus de vingt types cellulaires différents (tableau I) et nos observations se sont avérées être en tous points identiques.

Nous en concluons que les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères contiennent de l'ADN. Par contre, nous n'avons pas réussi à en mettre en évidence dans le constituant fibrillaire dense du nucléole du noyau d'un grand nombre de cellules de Mammifères. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par certains auteurs ayant fait appel à d'autres méthodes cytochimiques (Goessens, 1976b ; Ploton et al., 1983 ; Scheer et al., 1987). D'autre part, lorsque nous appliquons la réaction cytochimique inspirée de la réaction de Feulgen sur les cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris et comparons une coupe ultrafine contrastée classiquement avec la coupe suivante colorée à l'ammine d'osmium (Thiry and Goessens, 1996), nous ne voyons pas non plus, contrairement à Derenzini (Derenzini et al., 1982, 1983), de dépôt d'ammine d'osmium sur les fibrilles denses des nucléoles.

Quant à la sauvegarde de la réactivité des antigènes cellulaires, elle ne se garantit, en général, qu'au détriment de la conservation de l'ultrastructure. Il est donc difficile de déduire si un marquage est circonscrit à un constituant lorsque ce dernier n'est pas clairement identifié et présente des limites diffuses. De plus, peu d'auteurs prennent en considération les interstices localisés à la périphérie des centres fibrillaires et/ou entre les cordons de fibrilles denses, contenant des petits amas de chromatine (Thiry and Goessens, 1992a, 1996).

A notre avis, les conclusions discordantes concernant la localisation de l'ADN proviendraient de la difficulté à lire les informations fournies par les systèmes de détection de l'ADN.

Le choix du modèle cellulaire n'est pas non plus sans inconvénient. Si nous analysons une coupe ultrafine dans un nucléole du noyau d'une cellule contrastée classiquement, une partie de la surface occupée par le centre fibrillaire, de structure très peu dense aux électrons, pourrait être masquée par la bordure du constituant fibrillaire dense, de structure très dense aux électrons. Cette surestimation de la surface occupée par le constituant fibrillaire dense entourant le centre fibrillaire est d'autant plus prononcée que le centre fibrillaire est de petite taille (figure 10). Pour minimiser cette source d'erreurs, il est donc préférable de travailler sur des nucléoles possédant de larges centres fibrillaires tels ceux présents dans les noyaux de la cellule tumorale d'Ehrlich de la Souris ou dans ceux du lymphocyte humain au repos. Certaines incidences de coupes ultrafines dans les centres fibrillaires peuvent conduire à de fausses conclusions. Ce fait n'est pas rare. Certains auteurs considèrent que des filaments d'ADN colorés par l'ammine d'osmium et sis aux confins des centres fibrillaires sont dans le constituant fibrillaire dense ; d'autres attribuent des particules d'or, déposées à la limite extérieure des centres fibrillaires, au constituant fibrillaire dense. Comme expliqué dans le schéma de la figure 10, des particules d'or, qui semblent être sur le constituant fibrillaire dense proche du centre fibrillaire ou à la limite entre les deux, pourraient se trouver en réalité sur le centre fibrillaire. Nous avons veillé à le vérifier en pratique ; des coupes transversales de coupes semi-fines de cellules marquées par la méthode d'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique montrent sans équivoque que les particules d'or sont bien limitées aux seuls centres fibrillaires des nucléoles des noyaux (Thiry and Goessens, 1996).

Les localisations de l'ADN ribosomique par hybridation *in situ* sont également faillibles ; en effet, si les hybrides ADN/ARN sont plus stables que les hybrides ADN/ADN, ils peuvent, par contre, croiser avec l'ARN ribosomique et occasionner un marquage sur le constituant fibrillaire dense voire sur le constituant granulaire. C'est pourquoi nous avons choisi pour détecter l'ADN ribosomique de ne marquer qu'un seul brin du fragment d'ADN ribosomique, soit celui qui correspond à l'ARN ribosomique, empêchant ainsi toute hybridation croisée de la sonde avec ce même ARN ribosomique (Thiry and Thiry-Blaise, 1989).

En conclusion, la technique d'allongement des extrémités libres de l'ADN par la terminale transférase est une méthode de choix, sensible, spécifique et d'application indépendante du mode de préparation du matériel biologique (Thiry, 1992b, 1995a, 1995b ; Thiry and Puvion-Dutilleul, 1995 ; Compère et al., 1997 ; Zatssepina et al., 1997b ; Thiry and Daneholt, 1998 ; Thiry, 1999 ; Jennane et al., 1999) ; elle nous a permis de lever toute équivoque sur la distribution générale de l'ADN. Dans les nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères, elle ne révèle pas d'ADN dans le constituant fibrillaire dense mais uniquement dans les centres fibrillaires et la chromatine condensée intra- et périnucléolaire. Il reste à préciser la nature active ou inactive de l'ADN présent dans les différentes structures ; tel sera l'objectif du chapitre suivant.

2. 1. 2. Localisation ultrastructurale des régions actives de la chromatine associée au nucléole

La particularité de l'ADN du noyau des cellules eucaryotes est son association avec des histones pour former des structures répétitives caractéristiques : les nucléosomes (Olins and Olins, 1974 ; van Holde, 1988). Le noyau nucléosomique est édifié à partir d'environ cent quarante-six paires de bases d'ADN double brin entourant de deux tours superhélicoïdaux gauches l'extérieur d'un octamère formé de quatre paires d'histones H2A, H2B, H3, H4 ; il est séparé du noyau nucléosomique suivant par un segment d'ADN d'une longueur variable (entre quinze et cent paires de bases), allié à une cinquième histone, H1 ; cette dernière contribuerait à la condensation de la chromatine (Thomas, 1984 ; Bednar et al., 1998).

D'après des données résultant d'études biochimiques ou de microscopie électronique, ce type d'organisation se rencontrerait quel que soit l'état de la chromatine (Reeves, 1984).

Toutefois, lorsque les gènes deviennent transcriptionnellement actifs, un relâchement dans la compacité du nucléosome le rendrait sensible aux actions de nucléases telles l'ADNase I et la nucléase micrococcale (Weintraub and Groudine, 1976 ; Bloom and Anderson, 1978 ; Bellard et al., 1980) ; les promoteurs et les éléments activateurs de la transcription des gènes font partie des secteurs où les nucléases endommagent l'ADN (Elgin, 1988 ; Krude and Elgin, 1996).

Nous avons mis à profit cette faiblesse particulière de la chromatine active vis-à-vis de certaines enzymes pour la localiser au sein des nucléoles. Dans ce but, nous avons adapté la méthode de "nick-translation" à la microscopie électronique (Thiry, 1991b, 1995b, 1999) et, de plus, mis au point un système de transcription *in vitro* sur coupes ultrafines de matériel biologique (Thiry and Goessens, 1991 ; Thiry, 1999).

Dans la première approche (Thiry, 1991b, 1995b, 1999), des concentrations bien précises d'ADNase I (d'origine pancréatique) occasionnent des coupures simple brin dans l'ADN double brin présent à la surface de la coupe ultrafine dans des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris. Sur ces coupes mises au contact des quatre désoxynucléotides triphosphatés spécifiques dont certains sont biotinylés, l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli* synthétise un nouveau brin d'ADN à partir de la cassure en y incluant les désoxynucléotides biotinylés fournis. Grâce à l'emploi d'une méthode immunocytologique indirecte, nous détectons les nouveaux fragments d'ADN.

Dans la deuxième approche (Thiry and Goessens, 1991 ; Thiry, 1999), l'ARN polymérase I d'*Escherichia coli* induit, assistée des quatre ribonucléotides triphosphatés dont l'UTP est biotinylé, la mise en route de la transcription des gènes présents à la surface de la coupe ultrafine dans les cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris. Une technique immunocytologique indirecte nous permet de révéler les sites d'incorporation de l'UTP biotinylé.

Dans la procédure de "nick-translation" (Thiry, 1991a), après l'action de faibles concentrations d'ADNase I, nous obtenons, sur le nucléole, un marquage au niveau de la périphérie des centres fibrillaires ainsi que dans les interstices qui les bordent et interrompent la couronne de fibrilles denses. Dès que nous augmentons la concentration de l'ADNase I, le marquage qui s'ensuit s'étend à toute la chromatine condensée associée au nucléole ; mais, à aucune concentration d'ADNase I, nous ne constatons de marquage sur les constituants fibrillaire dense et granulaire.

Par la technique de transcription *in vitro* (Thiry et Goessens, 1991), les centres fibrillaires des nucléoles sont préférentiellement marqués à leur pourtour mais les constituants fibrillaire dense et granulaire ne le sont jamais.

Les résultats de la localisation de l'ADN par la réaction à l'ammine d'osmium suggéraient, qu'au niveau des centres fibrillaires des nucléoles, l'ADN serait sous forme non nucléosomique (Derenzini et al., 1982, 1983, 1987) ; or, dans nos expériences, ce sont également les centres fibrillaires les premiers sites les plus fragiles à l'attaque de l'ADNase I.

De notre analyse, il ressort que l'emploi de nos deux protocoles nous offre la possibilité de faire la distinction entre les régions inactives de la chromatine et des régions actives ou potentiellement actives, c'est-à-dire des zones où la transcription des gènes ribosomiques s'amorce, se déroule ou se termine .

Après application de ces deux techniques, les sites positifs observés correspondent à des structures connues pour leur contenu en ADN et plus spécialement en ADN ribosomique comme nous l'avons montré précédemment (Thiry and Thiry-Blaise, 1989). De notre point de vue, les gènes ribosomiques actifs ou en voie de le devenir ou venant de l'être se limiteraient, dans le nucléole, aux centres fibrillaires et aux interstices y annexés. Si la structure des gènes ribosomiques a été décrite, leur disposition dans les compartiments nucléolaires n'a pas été clairement établie ; or, ce renseignement pourrait se révéler très utile. Nous aborderons cette question dans le chapitre suivant.

2. 1. 3. Localisation ultrastructurale de régions des intercalaires des gènes ribosomiques par hybridation *in situ*

Chez les Eucaryotes supérieurs, les gènes ribosomiques sont organisés en tandems répétitifs (Long and Dawid, 1980 ; Hadjiolov, 1985). Sur chaque gène, une région (où se succèdent un intercalaire externe 5', la séquence à transcrire pour donner l'ARN 18S, un intercalaire interne 1, la séquence à transcrire pour donner l'ARN 5,8S, un second intercalaire interne 2, la séquence à transcrire pour donner l'ARN 28S et un intercalaire externe 3') est flanquée de zones nommées intercalaires intergéniques. Par exemple chez la Souris, ces derniers couvrent quasi les deux tiers de la longueur totale du gène (Cory and Adams, 1977). Selon une estimation des biochimistes, septante-cinq pour cent des gènes ribosomiques se logeraient dans la fraction intranucléolaire de la chromatine associée au nucléole (Bachelier et al., 1977) et nul n'objecte, qu'en activité, ils soient exclusivement contenus dans le nucléole.

La distribution de l'ADN par voie cytochimique ou immunocytologique implique les centres fibrillaires des nucléoles et la chromatine apparente dans les interstices sous forme de petits amas de densité aux électrons équivalente à celle de la chromatine condensée périnucléolaire (Goessens, 1979, 1984 ; Scheer et al., 1987 ; Thiry, 1988b ; Thiry et al., 1988a ; Thiry, 1991a ; Thiry et al., 1991a ; Thiry, 1992b, 1992c ; Thiry and Goessens, 1992a ; Scheer et al., 1993 ; Thiry et al., 1993 ; Thiry and Goessens, 1996).

Les auteurs qui appliquent la réaction à l'ammine d'osmium sur des coupes ultrafines de matériel cellulaire postulent une configuration nucléosomique pour la chromatine incluse dans les interstices et une organisation non nucléosomique pour les filaments élongés dans les centres fibrillaires (Derenzini et al., 1987)

Sur étalement moléculaire, l'unité de transcription des gènes ribosomiques des cellules de Mammifères durant l'activité transcriptionnelle correspond à un axe mince et uniforme, tandis que l'intercalaire intergénique reste sous la forme d'un "collier de perles" tel l'aspect habituel sous lequel apparaît la chromatine transcriptionnellement inactive (Puvion-Dutilleul and Bachelier, 1979).

Par hybridation *in situ*, Puvion -Dutilleul et al. (1991a) ont localisé, dans les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux des cellules HeLa, la séquence à l'origine de l'ARN 18S, un fragment de l'intercalaire 5' externe et une petite région de l'intercalaire intergénique, plus exactement l'extrémité contenant le promoteur jouxtant le point d'origine de la mise en route de la transcription.

Nous pensons que l'agencement précis des différents éléments constitutifs des gènes ribosomiques au cœur du nucléole est inféodé à la spécialisation fonctionnelle de chaque territoire nucléolaire. Nous avons fait un premier pas pour connaître cet arrangement en mettant au point une méthode non isotopique d'hybridation *in situ* de mise en évidence d'un petit fragment d'une zone de l'unité de transcription du gène ribosomique au niveau ultrastructural (Thiry and Thiry-Blaise, 1989). Nous avons adopté le même procédé d'expérimentation pour localiser l'intercalaire 5' externe et l'intercalaire intergénique des gènes ribosomiques dans la cellule tumorale d'Ehrlich de la Souris (Thiry and Thiry-Blaise, 1991).

Nous avons cloné deux séquences des gènes ribosomiques à partir d'un fragment Eco R1 Mr 974 de 11,35 kb de l'ADN ribosomique de la Souris. Le fragment A Eco R1/Sal 1 de 3,8 kb de l'intercalaire intergénique est cloné dans le plasmide pBR 322 (sonde A) et le fragment E Sal 1 de 0,55 kb de l'intercalaire 5' externe est inséré dans le plasmide pBR 325 (sonde E). Les sondes biotinylées obtenues sont hybridées sur des coupes ultrafines dénaturées de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris et les molécules hybrides résultantes sont ensuite visualisées au moyen d'une méthode immunocytoologique indirecte usant d'anticorps antibiotine et d'anticorps secondaires couplés à des particules d'or.

Les deux sondes fournissent un marquage strictement limité aux nucléoles. Sur quelque cent nucléoles observés, la molécule hybride produite à partir de la sonde E se rencontre au niveau de la périphérie des centres fibrillaires (figure 11a), tandis que celle produite à partir de la sonde A se révèle préférentiellement dans les petites mottes de chromatine condensée logées dans les interstices qui interrompent la couronne de fibrilles denses (figure 11b).

Par hybridation *in situ* avec ces deux sondes, aucune molécule hybride n'est détectée dans les constituants fibrillaire dense et granulaire ; seules quelques rares l'ont été dans la chromatine condensée périnucléolaire.

Nos observations nous conduisent à considérer qu'un gène ribosomique en transcription s'oriente dans les compartiments nucléolaires, la zone à transcrire à la bordure des centres fibrillaires et la majeure partie de la région de l'intercalaire intergénique au niveau des interstices bordant les centres fibrillaires et séparant les cordons de fibrilles denses au contact des centres fibrillaires. D'autres auteurs (Puvion-Dutilleul et al., 1991a) ont montré qu'un morceau de la région promotrice du gène ribosomique actif serait également présent dans les centres fibrillaires.

Sachant qu'une inhibition de l'expression des gènes ribosomiques métamorphose le nucléole de la cellule, dans le prochain chapitre, nous utiliserons ce phénomène pour tenter de débrouiller la relation des gènes ribosomiques entre eux.

2. 1. 4. Devenir de l'ADN associé au nucléole après une inhibition de la transcription des gènes ribosomiques

Que le nucléole soit l'expression morphologique de l'activité des gènes ribosomiques est une hypothèse devenue incontournable ; tout bouleversement structurel l'affectant, par

exemple lors de la mitose ou de la ségrégation nucléolaire, atteste un changement dans le processus de synthèse des ARN ribosomiques.

Dans le noyau d'une cellule au stade prophase, la dislocation du nucléole s'apparente à un arrêt de l'activité des gènes ribosomiques et, sa réédification à la fin du stade télophase, à la reprise de la genèse des ARN ribosomiques (Taylor, 1960 ; Chèvremont and Baeckeland, 1961 ; Prescott and Bender, 1962 ; Das, 1963 ; Feinendegen and Bond, 1963 ; King and Barnhisel, 1967 ; Lepoint and Goessens, 1978).

Quant à la ségrégation induite par l'action d'un inhibiteur de la transcription des gènes ribosomiques tel l'actinomycine D, elle modifie profondément l'agencement habituel des compartiments nucléolaires fondamentaux (Bernhard et al., 1965 ; Busch and Smetana, 1970 ; Simard et al., 1974 ; Daskal, 1979 ; Puvion and Moyne, 1981 ; Bouteille et al., 1982 ; Hadjiolov, 1985).

Ces cas de figure, mitose et ségrégation, représentent un terrain de prédilection pour l'étude des liens existant entre la morphologie et la fonction du nucléole dans la cellule.

Précédemment, nous n'avions pas pu mettre en évidence de l'ADN dans le matériel fibrillaire argyrophile de la constriction secondaire du chromosome au stade métaphase, ainsi que dans les centres fibrillaires des nucléoles après ségrégation (Thiry et al., 1988b). Or, non seulement, d'autres auteurs y localisent des protéines impliquées dans la transcription des gènes ribosomiques (Scheer and Rose, 1984 ; Guldner et al., 1986 ; Rodriguez- Sanchez et al., 1987 ; Chan et al., 1991 ; Roussel et al., 1993 ; Zatssepina et al., 1993 ; Weisenberger and Scheer, 1995 ; Gilbert et al., 1995 ; Jordan et al., 1996 ; Roussel et al., 1996 ; Gébrane-Younès et al., 1997 ; Junera et al., 1997 ; Klein et al., 1998 ; Sirri et al., 1999), mais il ressort d'une analyse par tomographie que la constriction secondaire serait une boucle torsadée de matériel intégrée dans le chromosome et non distincte (Héliot et al., 1997). Enfin, par hybridation *in situ*, Puvion-Dutilleul et al. (1992) visualisent de l'ADN ribosomique dans les centres fibrillaires des nucléoles après ségrégation des noyaux des cellules HeLa.

Ces informations souffraient quelques contradictions avec nos résultats et reposaient le problème d'une présence ou non d'ADN dans les NOR de la mitose ou dans les centres fibrillaires des nucléoles après ségrégation.

Grâce à l'emploi de la technique d'allongement des extrémités libres de l'ADN par la terminale transférase, qui supplante avec efficacité les méthodes que nous avons employées antérieurement, nous décelons effectivement de l'ADN en quantité significative dans les centres fibrillaires des nucléoles après ségrégation suite au traitement par l'actinomycine D de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, et dans le NOR du chromosome au stade métaphase (Héliot et al., 1997) ; dans cette dernière structure, postulée être la contrepartie mitotique des centres fibrillaires, il se distribue de préférence à la périphérie du matériel fibrillaire, répartition ne différant guère de celle rencontrée dans les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux des cellules en interphase.

Nous obtenons des résultats identiques sur les nucléoles après ségrégation, soit de noyaux d'hépatocytes traités par la galactosamine (Mikhaylova et al., 1996), soit de noyaux de cellules carcinomateuses RT4 de la vessie soumises à des doses élevées d'aménantrone ou d'un mélange d'aménantrone/poly r(A-U) (Thiry et al., 1997).

Dans le cas des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, traitées par la tubercidine (7-déaza- adénosine, antibiotique ; Acs et al., 1964 ; Bloch et al., 1967 ; Bassleer et al., 1976), il nous a été possible de suivre la mise en place progressive de la ségrégation (figure 12). Les centres fibrillaires des nucléoles s'organisent en convois dans lesquels ils sont enchaînés les uns aux autres par de petits maillons de chromatine condensée. Ces trains s'acheminent vers l'extérieur des nucléoles en convergeant l'un vers l'autre pour finalement se fondre en un seul élément.

La description de ce phénomène illustre parfaitement cette alternance itérative de la chromatine condensée et décondensée.

En conséquence, en dehors de tout mouvement de synthèse ribonucléique, de l'ADN décondensé persiste dans les centres fibrillaires des nucléoles et dans leur équivalent en métaphase, en contiguité avec la chromatine condensée à la manière d'une corde à nœuds, les centres fibrillaires étant les nœuds.

L'ADN et spécialement l'ADN ribosomique, qui préside à tout l'avenir de l'ARN ribosomique, étant situés dans le nucléole, les chapitres suivants porteront sur la localisation de l'ARN et plus particulièrement sur celle de l'ARN ribosomique, ce matériau fondamental du nucléole.

2. 1. 5. Détection ultrastructurale de l'ARN et de l'ARN ribosomique dans le nucléole par des méthodes immunocytologiques et d'hybridation *in situ*

A coté des gènes ribosomiques, le nucléole abonde d'ARN ; en plus de préARN ribosomiques et de séquences d'ARN ribosomiques 18S, 5,8 S et 28 S, s'y rencontrent également de faibles quantités de petits ARN non ribosomiques tels l'ARN U3 et l'ARN U8 (Hadjiolov, 1985 ; Fisher et al., 1991 ; Puvion-Dutilleul et al., 1991b, 1992 ; Azum-Gelade et al., 1994 ; Matera et al., 1994). A l'heure actuelle, personne ne met en doute la richesse en ARN des constituants fibrillaire dense et granulaire des nucléoles ; par contre, la mise en évidence d'ARN dans le centre fibrillaire convainc beaucoup moins.

La révélation par autoradiographie de l'uridine tritiée incorporée *in vivo* ou *in vitro* dans le matériel biologique a été une excellente approche qui a fourni des indications précieuses mais insuffisantes quant à la distribution générale de l'ARN. De plus, sa pratique requiert de longs laps de temps, sa résolution est peu élevée et ses signaux ne sont pas ponctuels.

La faculté de fabriquer un complexe à partir du couplage d'une ribonucléase avec des particules d'or a paru de prime abord une solution de remplacement avantageuse (Bendayan, 1981 ; Bendayan, 1984 ; **Thiry, 1988a** ; Cheniclet et al., 1995). Hélas, les ARN détectés étaient uniquement tributaires du type de ribonucléase choisie (Cheniclet and Bendayan, 1990) ; mais les plus gros écueils rencontrés dans la pratique de cette technique sont les problèmes d'encombrement stérique nés de la grosseur des complexes formés.

Dans notre quête de la distribution exacte de l'ARN total dans le nucléole, nous avons mis au point deux procédures immunocytologiques à l'échelle ultrastructurale.

La première exploite la propriété d'une transférase spécifique à catalyser l'addition d'adénosine monophosphate à l'extrémité 3' de l'hydroxyle de l'ARN simple brin pour ajouter de l'adénosine triphosphate biotinylée dans les séquences d'ARN présentes à la surface des coupes ultrafines dans les cellules (**Thiry, 1993a, 1995a, 1995b, 1999**). Ces nucléotides incorporés sont ensuite visualisés par un procédé immunocytologique indirect faisant intervenir un anticorps antibiotine et un anticorps secondaire couplé à des particules d'or (figure 13).

La seconde méthode repose sur l'emploi d'anticorps monoclonaux antiARN (mis gracieusement à notre disposition) sur des coupes ultrafines de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris après enchâssement en résine partiellement hydrosoluble (**Thiry, 1992c, 1999**).

Ces deux techniques ne pâtissent pas des faiblesses des anciennes méthodes ; au contraire, elles allient rapidité, spécificité, haute résolution et sont moins subordonnées à des

difficultés d'accessibilité (Thiry, 1993b, 1993c, 1994, 1995a, 1995c ; Thiry and Puvion-Dutilleul, 1995 ; Mikhaylova et al., 1996 ; Thiry and Goessens, 1996 ; Thiry et al., 1997 ; Thiry and Daneholt, 1998).

Il est possible d'appliquer la procédure d'allongement des ARN par une transférase spécifique sur des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris après fixation et acétylation (Thiry, 1993a) ; sous ces conditions, nous obtenons une image assez complète de la distribution de l'ARN total sur des constituants parfaitement identifiables et bien délimités.

Dans les nucléoles des noyaux des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris (Thiry, 1992c), des cellules HeLa (Thiry, 1992c, 1993c) et des cellules humaines de Sertoli (Thiry, 1993b), les particules d'or se répartissent sur les trois compartiments, mais sur les centres fibrillaires : leur nombre semble plus élevé à la périphérie. Aucune particule ne se dépose sur la chromatine condensée, même sur celle incluse dans les interstices au contact des centres fibrillaires. Dans différents types cellulaires, nous obtenons un marquage parfaitement identique avec les deux anticorps antiARN ; toutefois, sur les centres fibrillaires, le signal est plus faible puisque ces anticorps ciblent préférentiellement certaines séquences d'ARN (Thiry, 1992c).

Bien qu'ayant antérieurement localisé l'ARN ribosomique par hybridation *in situ* (Thiry and Thiry-Blaise, 1989), nous avons tenté d'améliorer nos résultats grâce à la construction d'une sonde doublement marquée plus performante (Thiry and Thiry-Blaise, 1991). L'emploi de cette dernière nous a permis de visualiser des quantités d'ARN ribosomique plus démonstratives dans les constituants fibrillaire et granulaire du nucléole ainsi que dans les centres fibrillaires, de préférence à leur bordure.

Grâce à ces processus et à l'hybridation *in situ*, nous démontrons que l'ARN ribosomique est non seulement présent dans les constituants fibrillaire et granulaire des nucléoles mais également au niveau de leurs centres fibrillaires. Ces observations nous ont amené à nous demander, au niveau de chaque compartiment, quelle étape de la transcription du gène ribosomique cet ARN ribosomique figurait. Nous tenterons de répondre à cette question dans le prochain chapitre.

2. 1. 6. Localisation des ARN naissants dans le nucléole par immunocytologie ultrastructurale

L'autoradiographie a été la méthode support par excellence pour l'étude *in situ* des synthèses des ARN (Bouteille et al., 1975 ; Fakan, 1976 ; Goessens, 1976b ; Fakan, 1978, 1986). Elle est à l'origine des résultats considérés comme les plus probants, par la majorité des auteurs, sur le site de la transcription des ARN. L'hypothèse la plus vivace postule que le constituant fibrillaire dense du nucléole serait le site initial d'incorporation d'uridine tritiée dans la cellule (Fakan, 1978 ; Goessens, 1984 ; Fakan, 1986 ; Schwarzacher and Wachtler, 1987), quoique quelques auteurs ne négligent pas le fait que les centres fibrillaires soient également concernés (Goessens, 1976b ; Thiry et al., 1985 ; Dupuy-Coin et al., 1986 ; Derenzini et al., 1987).

Face aux dangers d'interprétation soulevés par les inconvénients inhérents à la pratique elle-même de l'autoradiographie, nous avons choisi de vérifier la sensibilité de la technique sur des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, incubées durant un temps fixe de dix minutes dans un milieu nutritif contenant de l'uridine tritiée (Thiry and Goessens, 1991).

Nous savons que le nombre de grains d'argent révélés sur une structure reflète la quantité de produit radioactif incorporé dans la dite structure et que, dans le cas d'isotopes de longue durée de vie, ce nombre de grains d'argent sera d'autant plus important que les temps d'exposition seront longs. Donc, à des temps courts d'exposition, sont positifs les endroits où

la teneur par unité de surface en molécules radioactives est la plus élevée et, à des temps d'exposition plus longs, s'ajoutent ceux dont la concentration en molécules radioactives est plus faible.

Lorsque peu de temps après sa pose, nous développons l'émulsion photographique coulée sur des coupes de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, fixées et enchâssées en résine, elle est impressionnée uniquement au niveau du constituant fibrillaire dense du nucléole. Dès que nous allongeons les temps d'exposition, un marquage apparaît au niveau des régions extranucléolaires ainsi que dans les centres fibrillaires, tandis que s'intensifie celui préalablement présent sur le constituant fibrillaire dense. Le constituant granulaire et la résine n'en supportent jamais, quel que soit le temps d'exposition (Thiry and Goessens, 1991). Toutefois, ces observations méritent réflexion et discussion.

En effet, les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux des cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris sont de très grande taille ; la résolution des préparations autoradiographiques est telle que nous ne pouvons pas certifier que les grains d'argent révélés sont localisés exactement au-dessus de la source responsable de leur réduction ; explicitement, la cause du marquage du centre fibrillaire pourrait prendre son origine au sein du constituant fibrillaire dense ou *vice versa*.

Pour parer aux désavantages de l'autoradiographie à l'échelle ultrastructurale, certains auteurs ont tenté d'adopter ce principe d'incorporer *in vivo* aux ARN nouvellement synthétisés, non pas une molécule radioactive, mais un analogue non isotopique ; sa présence dans le matériel biologique fixé serait décelée ultérieurement par une méthode immunocytologique, (Jackson et al., 1993 ; Wansink et al., 1993).

Hélas, l'introduction de bromouridine triphosphate dans la cellule vivante occasionne de tels préjudices organiques que les conséquences de ces essais compliquent plus qu'elles n'éclairent sur les sites de synthèse ou de maturation de l'ARN.

Après avoir expérimenté nous-même ce type d'approche (Thiry, 1999), nous lui avons préféré un système de transfection moins invalidant pour la physiologie de la cellule (Thiry et al., 2000, 2001).

Le vecteur qui sert de transporteur aux nucléotides est de nature lipidique. A l'aide d'un procédé immunocytologique, nous avons pu montrer que la cellule avait métabolisé notre analogue en le localisant en premier dans le noyau, puis lorsqu'il atteint le cytoplasme, dans ce dernier.

Nous intéressent plus particulièrement à la biogenèse des ribosomes, nous soumettons les cellules à l'action de l' α -amanitine qui inhibe spécifiquement l'action des ARN polymérases II et III, privilégiant l'incorporation par l'ARN polymérase I du bromouridine triphosphate dans le nucléole.

Nous avons réalisé en parallèle l'étude de la synthèse de l'ARN ribosomique en microscopies confocale et électronique ; sur des cellules HeLa, nous maintenons un temps de lipofection fixe mais nous multiplions les durées de remise en culture.

A l'échelon optique, l'incorporation de bromouridine triphosphate se manifeste par étapes et adopte au cours de leur déroulement quatre grands types de figure caractéristiques. Après des remises en culture suite à la transfection des cellules allant de deux, quinze, trente à cent vingt minutes, nous visualisons le bromouridine triphosphate dans le nucléole sous forme de petites sphères exactement là où se localise l'ARN polymérase I ; ces sphères gagnent en ampleur mais, en leur centre, perdent en intensité ; ensuite elles se creusent et prennent la forme de larges anneaux qui finissent par fusionner et n'en constituer qu'un seul, limitant la totalité du nucléole.

Nous avons examiné les phases de la même expérience à des stades identiques mais sur les cellules HeLa préparées pour la microscopie électronique. Au tout début, le marquage se répartit sur les deux constituants fibrillaires du nucléole, puis il libère progressivement les centres fibrillaires, s'accrochant aux seules fibrilles denses les encerclant ; ensuite, désertant la couronne fibrillaire immédiatement au contact des centres fibrillaires, il s'irradie dans l'ensemble du constituant fibrillaire dense, qu'il quitte à son tour, pour investir le constituant granulaire (figure 14).

La transcription des gènes ribosomiques est un phénomène qui se déroule promptement, les ARN ribosomiques produits atteignent rapidement une grande taille, se détachent et s'éloignent très vite de leur lieu de synthèse.

Afin d'en analyser minutieusement le cheminement dès sa mise en route et d'en disséquer les étapes initiales, nous nous sommes tourné vers un modèle où le mécanisme serait ralenti (Cheutin et al., 2001). Nous avons travaillé sur des nucléoles de noyaux de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, isolés à l'aide d'une méthode qui veille à leur préservation (Vandelaer et al., 1996) ; lorsqu'ils sont retirés de leur contexte naturel, la transcription s'y effectue plus lentement.

Le bromouridine triphosphate leur est intégré durant le maintien de leur survie dans un milieu adéquat. Les observations faites sur coupes ultrafines réalisées dans ce matériel témoignent effectivement d'une activité dans les composants fibrillaires des nucléoles. Afin de nous assurer que le démarrage de la transcription par l'ARN polymérase I et l'allongement des ARN, qui suit immédiatement, n'ont pas lieu en un site commun, nous avons échafaudé un schéma expérimental qui désolidariserait, le cas échéant, ces deux événements précoces.

Si, dans un premier temps, nous fournissons aux nucléoles isolés du bromouridine triphosphate pendant dix minutes, puis durant vingt minutes de l'uridine triphosphate, il en résulte une accumulation du nucléotide marqué au brome dans le composant fibrillaire dense du nucléole, dépôt qui traduirait une présence massive d'ARN en cours d'allongement.

D'autre part, si nous soumettons pendant un laps de temps les nucléoles isolés à l'action de la cordycépine, puis que nous la retirons du milieu et que les nucléoles isolés sont remis en présence de bromouridine triphosphate, la transcription s'enclenche de nouveau et ce sont, dans ces conditions, les centres fibrillaires qui accueillent la majorité du nucléotide bromé. Rappelons que la cordycépine possède la faculté de bloquer la transcription en empêchant l'allongement et en provoquant un décrochage prématuré des ARN en train d'être élaborés (Siev et al., 1969 ; Suhadolnik, 1979). Nous en déduisons que les centres fibrillaires des nucléoles correspondent au tout premier site d'utilisation du nucléotide marqué, ce que suggérerait par ailleurs les localisations de l'ARN polymérase I dans ce seul compartiment nucléolaire (Scheer et Rose, 1984).

Ainsi, grâce à la mise au point d'une procédure nouvelle dont l'autoradiographie a servi de marchepied, nous avons pu fractionner, dans un matériel cellulaire hautement conservé, la dynamique de préparation des ribosomes depuis leur lieu d'élaboration jusqu'à leur destination finale, leur formation terminée (Thiry et al., 2000, 2001).

Les acides nucléiques ne sont pas les seuls participants à la biogenèse des ribosomes, un grand nombre de protéines y sont impliquées mais le rôle qu'elles y jouent est encore peu exploré. Le prochain chapitre aura trait à la localisation d'une protéine susceptible d'influer sur le déroulement de la synthèse des ARN ribosomiques.

2. 1. 7. Localisation ultrastructurale d'une protéine associée à l'ARN polymérase I

Les acides nucléiques sont les acteurs essentiels de l'organisation fonctionnelle du nucléole, mais autour d'eux s'articulent une multitude de protéines dont il est difficile de débrouiller le pourquoi de leur présence à tel ou tel niveau, en telle ou telle proportion et leur part prise à tel ou tel moment du processus de fabrication des ribosomes (Olson, 1990 ; Hernandez-Verdun, 1991).

L'ARN polymérase I a retenu tout particulièrement notre attention car elle est l'enzyme obligée de la transcription des gènes ribosomiques. Elle se rencontrerait, selon les uns, exclusivement dans les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux de divers types cellulaires (Scheer and Rose, 1984 ; Hadjiolova et al., 1986 ; Scheer and Raska, 1987 ; Reimer et al., 1987a, 1987b ; Ochs et al., 1988), alors que d'autres auteurs en révèlent également une petite quantité dans les fibrilles denses encerclant les centres fibrillaires (Raska et al., 1989, 1990, 1992 ; Raska and Dundr, 1993 ; Wachtler and Stahl, 1993 ; Raska et al., 1995). Rappelons que la topoisomérase I et l'UBF, protéines intervenantes de la transcription, ont aussi été mises en évidence dans des sites identiques (Raska et al., 1989 ; Scheer and Benavente, 1990 ; Raska et al., 1990, 1992 ; Rendon et al., 1992 ; Rodrigo et al., 1992 ; Raska and Dundr, 1993 ; Roussel et al., 1993 ; Zatschina et al., 1993 ; Raska et al., 1995).

Il y a peu, Grummt et son équipe ont identifié à partir de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, une protéine liée à l'ARN polymérase I, la RAP67, qui lors de sa purification reste alliée à une ARN polymérase I issue d'une sous-population active. Sa séquence montre une forte homologie avec une protéine humaine non encore caractérisée. Pour étudier sa distribution sur des coupes ultrafines de cellules tumorales d'Ehrlich de la Souris, nous avons appliqué la marche à suivre qui nous avait servi à confirmer la présence de protéines nucléolaires connues : la nucléoline dans les composants granulaire et fibrillaire dense du nucléole, et la fibrillarine uniquement dans les fibrilles denses (Vandelaer and Thiry, 1998).

Dans le nucléole, le marquage révélant la RAP67 se cantonne aux centres fibrillaires et ne se manifeste jamais sur les constituants granulaire et fibrillaire dense (Seither et al., 2001).

En résumé, une protéine associée à une fraction active de l'ARN polymérase I est uniquement présente dans le centre fibrillaire des nucléoles ; ce nouveau résultat constitue une donnée importante.

2. 1. 8. Discussion partielle

Toute information n'a de valeur de référence que si elle est le fruit d'une étude détaillée, contrôlée, reposant sur l'emploi d'outils fiables, performants et reproductibles. Poussé par la nécessité de respecter ces critères d'authenticité, nous avons développé un certain nombre de méthodes au niveau ultrastructural, soit en les adaptant, soit en les transposant, soit en innovant (Thiry, 1991b ; Thiry and Goessens, 1991 ; Thiry, 1992a, 1993a, 1995a, 1995b, 1999 ; Thiry et al., 2000, 2001).

L'apport considérable de résultats (figure 15) qu'elles nous ont fournis nous ont aidé à mieux comprendre comment le nucléole réalisait la formation du ribosome, ainsi qu'à vérifier et intégrer les hypothèses formulées par d'autres auteurs.

Nous montrons et confirmons qu'en dehors de la chromatine condensée, les centres fibrillaires des nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères contiennent de l'ADN, de l'ADN actif, de l'ADN ribosomique, présents également dans les interstices interrompant les fibrilles denses les entourant (Thiry, 1991a ; Thiry and Goessens, 1991 ; Thiry and Thiry-Blaise, 1991

; **Thiry, 1992b** ; **Thiry and Goessens, 1992a, 1992b** ; **Scheer et al., 1993** ; **Thiry, 1993b** ; **Vandelaer et al., 1993** ; **Thiry and Goessens, 1996**).

Par hybridation *in situ*, nous avons décelé un fragment de l'intercalaire externe 5' dans les centres fibrillaires et un fragment de l'intercalaire intergénique (précédant la région de l'élément activateur et du promoteur) dans les interstices y annexés (**Thiry and Thiry-Blaise, 1991**). Chez les Vertébrés supérieurs, cet intercalaire est très long ; dans le cas de la Souris, il représente environ les deux tiers des 44 kb des gènes ribosomiques (Cory and Adams, 1977) et est de configuration plus compactée que la région à transcrire, caractéristique propre aux Mammifères (Puvion-Dutilleul and Bachellerie, 1979).

Par ailleurs, nous détectons de l'ARN ribosomique dans les trois constituants nucléolaires (**Thiry, 1992c** ; **Scheer et al., 1993**) ; toutefois, la faible quantité présente en bordure des centres fibrillaires est en fait un résultat original qui fut appuyé ultérieurement par quelques auteurs, dont Puvion-Dutilleul et al. (1997), qui y mirent en évidence l'ARN de l'intercalaire externe 5' transcrit.

Ces données nous suggèrent un positionnement des gènes ribosomiques chevauchant les deux constituants fibrillaires des nucléoles, et désignent la zone du centre fibrillaire, à la frontière des fibrilles denses, comme l'unique candidate possible au site de leur transcription. Notre intention ne sera pas de passer en revue toutes les propositions qui ont servi à la démarche, mais à exposer les plus opportunes.

Une zone du promoteur de l'intercalaire intergénique, indispensable à la régulation de la transcription a été localisée dans le centre fibrillaire par hybridation *in situ* (Puvion-Dutilleul et al., 1991a). A cet endroit, il existe des éléments répétitifs (Moss and Stefanovsky, 1995 ; Grummt, 1999) auxquels vient se lier une protéine spécifique, l'UBF, qui, en plus, d'être présente dans le constituant fibrillaire dense (Raska et al., 1992 ; Rendon et al., 1992 ; Rodrigo et al., 1992 ; Roussel et al., 1993 ; Raska et al., 1995), l'est aussi dans le centre fibrillaire (Raska et al., 1992 ; Rendon et al., 1992 ; Rodrigo et al., 1992 ; Roussel et al., 1993 ; **Scheer et al., 1993** ; Zatssepina et al., 1993 ; Raska et al., 1995) ; or elle facilite et intensifie la transcription, constituant un précomplexe au niveau de l'élément activateur interagissant avec l'ARN polymérase I juste avant que cette dernière n'entame son travail (Bell et al., 1989, 1990 ; Jantzen et al., 1990 ; Pikaard et al., 1990 ; Smith et al., 1990 ; Voit et al., 1992 ; Kuhn et al., 1994 ; Putnam et al., 1994 ; Schnapp et al., 1994 ; Moss and Stefanovsky, 1995 ; Mc Stay et al., 1997 ; Grummt, 1999 ; Tuan et al., 1999).

Selon une analyse par tomographie (**Cheutin et al., 2001**), l'ARN polymérase I se répartirait essentiellement dans la région corticale des centres fibrillaires. Par ailleurs, nous avons montré qu'une protéine associée à une fraction active de l'ARN polymérase I se localiserait dans le centre fibrillaire (**Seither et al., 2001**).

Quant aux ARN naissants, visibles en premier dans les deux constituants fibrillaires, ils semblent se replier dans le centre fibrillaire dès que leur allongement est arbitrairement suspendu (**Thiry et al., 2000** ; **Cheutin et al., 2001**).

L'ARN U3, mis en évidence dans les fibrilles denses, l'a également été dans le centre fibrillaire (Fischer et al., 1991 ; Puvion-Dutilleul et al., 1991b, 1992 ; Raska et al., 1992 ; Raska and Dunder, 1993 ; Azum-Gelade et al., 1994 ; Raska et al., 1995) ; or il est connu en tant qu'intervenant aux premières étapes de clivage du préARN 45S (Kass et al., 1990).

Les séquences des intercalaires externes 5' et 3' du gène ribosomique sont considérés comme des sites d'ancrage (Bolla et al., 1985 ; Smith and Rothblum, 1987 ; Stephanova et al., 1993). Par analogie avec les événements ayant lieu à l'extrémité 5', nous supputons que la séquence de l'intercalaire externe 3' serait également située dans le centre fibrillaire. A son endroit, l'allongement des ARN se termine et les préARN 45S se détachent, ce pôle du gène dispose d'éléments bloquant l'action de l'ARN polymérase I (Grummt et al., 1986 ; Evers et al., 1995 ;

Grummt, 1999 ; Reeder, 1999), à l'encontre de son homologue 5' qui lui, bénéficie d'éléments stimulants (Grummt, 1999 ; Reeder, 1999).

Subséquentement, le centre fibrillaire arbitrerait donc la préparation et la mise en route de la transcription. Nous avons établi, que même lorsque les gènes ribosomiques sont au repos, de l'ADN décondensé y persiste (Mikhaylova et al., 1996 ; Thiry et al., 1997) ainsi qu'au niveau du matériel argyrophile du NOR (Héliot et al., 1997).

Quant au constituant fibrillaire dense, sa richesse en maints ARN n'est plus à prouver ; s'y rencontrent le snoARN U3 (Fischer et al., 1991 ; Puvion-Dutilleul et al., 1991b, 1992 ; Raska et al., 1992 ; Raska and Dundr, 1993 ; Azum-Gelade et al., 1994 ; Raska et al., 1995), qui catalyse le clivage précoce de l'intercalaire externe 5' et les clivages autour de l'ARN ribosomique 18S (Savino and Gerbi, 1990 ; Kass et al., 1990 ; Hughes and Ares, 1991 ; Hughes, 1996 ; Borovjagin and Gerbi, 1999), ainsi que les MRP et l'U8 (Matera et al., 1994 ; Jacobson et al., 1995) qui catalysent respectivement le clivage dans la région de l'intercalaire interne 1 et aux extrémités des ARN ribosomiques 5,8S et 28S (Schmitt and Clayton, 1993 ; Peculis and Steitz, 1993 ; Chu et al., 1994).

Sitôt construit, l'ARN se trouve dans le constituant fibrillaire dense où il s'allonge, où il arrive à maturité, où il se libère de l'axe du gène, où il se clive par degrés et où il y progresse. Malgré ces multiples fonctions qui intéressent les fibrilles denses, celles-ci ne se morcellent pas en parcelles différant par leur aspect morphologique ; par exemple, la région du clivage de l'intercalaire externe 3' ne se démarque pas de celle du clivage de l'intercalaire externe 5' alors que ce dernier ARN, localisé par hybridation *in situ*, est plus abondamment étendu dans les fibrilles denses que le premier cité (Lazdins et al., 1997). Même, lorsque les ARN naissants progressent dans le constituant fibrillaire dense, aucune caractéristique structurale ne permet de les pister ; les acteurs moléculaires fonctionnant au sein des fibrilles denses sont probablement de composition très proche et tellement imbriqués qu'indistincts.

La réunion de ces investigations personnelles, complétées par des travaux extérieurs récents, pose le fondement d'un modèle (figure 16) qui souligne le rôle prépondérant joué par le centre fibrillaire des nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères dans la transcription des gènes ribosomiques.

Pendant le phénomène de transcription, chaque unité répétitive ribosomique se confinerait aux parties fibrillaires et interstices y attachés. La région intergénique se pelotonnerait dans un interstice avant de pénétrer le centre fibrillaire en un point situé en amont de l'extrémité 5' de l'intercalaire intergénique, repoussant élément activateur et promoteur dans le centre fibrillaire. L'arborisation illustrant la région transcrite du gène ribosomique après étalement moléculaire, verrait son tronc d'ADN ressortir du centre fibrillaire au niveau de l'intercalaire externe transcrit 5' et s'étendre à la périphérie globulaire du centre fibrillaire tandis que les branches les plus courtes (ARN de l'intercalaire externe 5' transcrit), implantées dans l'enveloppe, adopteraient une orientation privilégiée et ensuite feraient saillie dans les fibrilles denses, imitées par les branches suivantes devenant de plus en plus longues ; le gène ribosomique ressortirait du centre fibrillaire dans un interstice, en un point de l'intercalaire intergénique situé légèrement en aval de la terminaison 3'.

Cette modélisation de l'unité répétitive ribosomique se décline de plusieurs façons. Telle que décrite, elle illustre un seul gène ribosomique contenu dans un petit centre fibrillaire, l'interstice l'avoisinant et les premières fibrilles denses le limitant (figure 16a). Un nucléole jalonné de tels petits centres fibrillaires correspondrait aux gènes ribosomiques en transcription distants les uns des autres mais toutefois entravés entre eux et reliés à la

chromatine périnucléolaire par l'une des petites mottes de chromatine condensée contenue dans l'un des interstices concernés (figure 16b). L'observation de coupes ultrafines sériées montre que, dans le cas d'un grand centre fibrillaire, le nombre de gènes ribosomiques présents serait proportionnel au nombre de mottes de chromatine condensée incluses dans les interstices les entourant (figure 16c) ; l'une ou l'autre de ces mottes réalisant la connexion avec la chromatine périnucléolaire (**Thiry and Goessens, 1996**).

Nous fondant sur le critère de répartition de l'ADN dans une cellule en mitose, il existe une certaine concordance entre la disposition du gène ribosomique au stade métaphase et l'agencement du gène ribosomique imaginé dans une cellule en interphase (**Héliot et al., 1997**). Les régions intergéniques s'entasseraient dans l'axe de la chromatide, alternativement, avec les régions à transcrire qui, elles, s'étendraient dans le cortex du matériel argyrophile (figure 17).

2. 2. Le nucléole dans le noyau d'autres cellules eucaryotes

A l'origine, la plupart des auteurs ne reconnaissaient que deux constituants ribonucléoprotéiques au nucléole, tout en faisant occasionnellement allusion à un troisième, d'aspect fibrillaire lâche qui semblait "pâlir" après digestion protéique par la pepsine. Cette troisième structure n'a été baptisée centre fibrillaire qu'en 1969 (Recher et al., 1969).

Elle a été la cible privilégiée des investigations du Professeur Goessens, qui les a plus particulièrement étudiées dans la cellule tumorale d'Ehrlich de la Souris, lignée cellulaire dont le nucléole du noyau possède de grands centres fibrillaires (Goessens, 1973, 1975). Il a formulé l'hypothèse que le centre fibrillaire correspondait, si pas totalement du moins en partie, au NOR (Goessens and Lepoint, 1974, 1979), conception qu'à l'époque il a exprimée dans un modèle (Goessens, 1984).

Ultérieurement, les moyens d'expérimentation ont évolué et les connaissances sur le sujet ont progressé. Depuis que nous avons repris ce thème de recherche, nous l'avons actualisé. Si le centre fibrillaire est un composant permanent de la cellule, autour duquel se reforme le nucléole en fin de mitose, nous avons abouti, *a posteriori*, à le créditer d'une responsabilité fondamentale dans la fonction du nucléole, celle d'orchestrer la transcription des gènes ribosomiques.

En dehors des cellules de Mammifères, les nucléoles des noyaux des cellules des Oiseaux et des Reptiles comptent également trois constituants (Hubert, 1975 ; Goessens, 1976a ; Mirre and Stahl, 1976 ; Knibiehler et al., 1977 ; Mirre and Stahl, 1978 ; Hernandez-Verdun and Bouteille, 1979).

Mais fait déroutant, il s'avère que les nucléoles des noyaux de cellules de certaines espèces d'Invertébrés et de Vertébrés inférieurs sont dépourvus de centre fibrillaire apparent (tableau II ; figure 18). Dans ces conditions, n'est-il pas abusif d'accorder au centre fibrillaire un rôle d'une telle valeur? Pour éprouver notre théorie, pour éclaircir et expliciter pourquoi les nucléoles diffèrent dans l'expression morphologique de leurs compartiments, il nous a paru nécessaire d'aborder leur étude dans diverses espèces tant des règnes animal et végétal que chez les Champignons.

2. 2. 1. Le nucléole dans les noyaux des cellules animales, non mammaliennes

Dans le nucléole des noyaux des cellules somatiques des Insectes (Kalnins et al., 1964 ; Stevens, 1964, 1965 ; Jacob, 1967 ; Favard-Soreno, 1968 ; Cave, 1976 ; Locke and Huie, 1980 ; Olins et al., 1980 ; Knibiehler et al., 1982 ; Morag et al., 1982 ; Knibiehler et al., 1984 ; Tröster et al., 1985 ; Scheer et al., 1997) et dans les nucléoles extrachromosomiques des ovocytes de *Xenopus laevis* (van Gansen and Schram, 1972 ; Angelier and Lacroix, 1975 ; Scheer et al., 1982 ; Boloukhere, 1984 ; Raska et al. 1985), seuls deux compartiments s'y distinguent : l'un formé de fibrilles est encadré de l'autre, constitué de granules.

Nonobstant que très récemment, Mais et Scheer (2001) aient semé le doute quant à cette assertion. En réalité, ils décrivent des centres fibrillaires dans les nucléoles extrachromosomiques de noyaux de cellules de *Xenopus laevis*, fixées et enchâssées dans le Lowycriol K4M. Ces centres fibrillaires ne sont toutefois plus observables si les auteurs modifient ou emploient une autre méthodologie de préparation en vue de leur examen au microscope électronique.

A l'exception de ce cas paradoxal, les deux zones des nucléoles des noyaux des cellules animales non mammaliennes contiennent généralement de l'ARN ribosomique, seule la région fibrillaire renferme de l'ADN et de l'ARN naissant (Karasaki, 1965 ; von Gaudecker,

1967 ; Knibiehler et al., 1982 ; Azevedo et al., 1984 ; Knibiehler et al., 1984 ; Raska et al., 1985 ; Pierron et al., 1989 ; Soyer-Gobillard et al., 1990 ; Géraud et al., 1991 ; Puvion-Dutilleul and Pierron, 1992 ; Pierron and Puvion-Dutilleul, 1993, 1996).

Nous avons appliqué différentes techniques cytochimiques et immunocytologiques sur la lignée Sf9 provenant d'un insecte lepidoptère, *Spodoptera frugiperda*, (Thiry et al., 1991b, 1993) et sur les cellules germinales d'un poisson téléostéen femelle, *Barbus barbus*, au cours de l'ovogenèse (figure 19). Plus accessoirement et plus ponctuellement, nous avons étendu nos observations à d'autres modèles.

La technique d'acétylation possède la précieuse propriété d'accentuer notablement les différences entre les compartiments nucléolaires (Thiry et al., 1985 ; Thiry and Goessens, 1986) ; couplée à l'imprégnation à l'argent, la quantité plus ou moins abondante d'argent métallique déposé sur la structure permet de distinguer respectivement les fibrilles denses du centre fibrillaire (Thiry et al., 1985 ; Ploton et al., 1987 ; Thiry and Goessens, 1996). Sur nos préparations des cellules Sf9 fixées et acétylées (Thiry et al., 1991b), une zone fibrillaire et une zone granulaire, nettement identifiables, se partagent l'entièreté de l'aire occupée par le nucléole dans le noyau. Après imprégnation à l'argent (Thiry et al., 1991b), le dépôt métallique épargne la région granulaire, mais recouvre la totalité de la région fibrillaire. Au niveau de celle-ci, il n'adopte pas une répartition homogène, quoique, *à priori*, les fibrilles sous-jacentes semblent structurellement identiques en tout point de la surface qu'elles occupent.

Grâce à la méthode d'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique (Thiry et al., 1993), nous visualisons une petite quantité d'ADN, dispersée uniquement dans la zone fibrillaire.

Pour mémoire, dans certains nucléoles de noyaux de cellules de Mammifères, les centres fibrillaires petits et quasi indistincts ne se démarquent qu'après ségrégation nucléolaire (Thiry and Goessens, 1996). Par acquis de conscience, nous avons soumis les cellules Sf9 à l'action de l'actinomycine D (Thiry et al., 1991b). L'inhibition de la transcription des gènes ribosomiques induit une ségrégation subséquente au niveau des nucléoles des noyaux mais par contre, aucun "centre fibrillaire" ne s'individualise dans la masse fibrillaire. Toutefois, de l'ADN ainsi que la fibrillarine, localisés dans cette région fibrillaire avant le phénomène de ségrégation, y perdurent malgré l'inhibition de la synthèse ribonucléique.

Dans la cellule en mitose (Thiry et al., 1991b), nous constatons que du matériel argyrophile persiste étroitement associé aux chromosomes, au stade métaphase.

Dans les nucléoles extrachromosomiques des noyaux des ovocytes chez le Barbeau, l'ADN mis en évidence au niveau de la zone fibrillaire (figure 19a) l'évacue dans son intégralité au cours de la vitellogenèse et s'accumule à l'extérieur sous forme de gros blocs de chromatine condensée. La pp135, protéine habituellement caractéristique des centres fibrillaires des nucléoles de Mammifères (Vandelaer and Thiry, 1998), se retrouve aux côtés de la fibrillarine dans la zone fibrillaire. Quant au dépôt d'argent à son niveau, il adopte une répartition homogène (figure 19b).

Dans les nucléoles des noyaux des hépatocytes de la Carpe, *Cyprinus carpio*, au cours de l'acclimatation saisonnière et dans les nucléoles des noyaux des cellules des glandes salivaires des larves d'un Insecte Diptère, *Chironomus tentans* (Thiry and Goessens, 1996), l'ARN abonde dans les deux zones tandis que l'emploi de la technique d'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique ne détecte de l'ADN que dans la zone fibrillaire. Dans différents organes d'un Amphibien Urodèle, *Pleurodèle waltii*, nous décelons, par le biais de la même méthode, de l'ADN uniquement dans la zone fibrillaire des nucléoles (Thiry et al., 1993).

A la lumière de nos observations, force nous est d'accepter que les nucléoles des noyaux des cellules animales non mammaliennes, se présentent sous une configuration de deux et non de trois compartiments, une région granulaire comparable à celle des nucléoles à trois constituants et une région fibrillaire n'étant ni des fibrilles denses, ni un centre fibrillaire, mais dont la composition s'apparente aux deux.

2. 2. 2. Le nucléole dans les noyaux des cellules végétales

Le nucléole des noyaux des cellules des Plantes est généralement envisagé comme un modèle de choix pour l'étude de la biogenèse des ribosomes. Trois critères de sélection priment en sa faveur. Ce nucléole possède un nombre élevé de gènes ribosomiques actifs, un matériel fibrillaire dense abondant et très étendu (Martin et al., 1989 ; Deltour and Motte, 1990 ; Risueno and Testillano, 1994), supposé ne renfermer que de l'ADN ribosomique. Enfin, les Plantes disposent de la faculté d'activer le système de transcription des gènes ribosomiques par voie naturelle. Selon les dires de certains auteurs, ces caractéristiques les prédisposent à plus de succès (Martin et al., 1989) dans l'étude des gènes ribosomiques que les cellules animales. Effectivement, à l'antithèse, les fibrilles denses des nucléoles de cellules de Mammifères ne s'y prêtent guère de par leur disposition propre en fine couronne et du peu d'ADN ribosomique présent dans leur nucléole. Quoique, de notre point de vue, ces justifications ne suffisent pas à expliquer la difficulté voire l'impossibilité de mettre en évidence de l'ADN à leur niveau.

Si les descriptions des nucléoles des noyaux des cellules des Plantes leur attribuent volontiers trois compartiments (Risueno and Medina, 1986 ; Jordan, 1987 ; Deltour and Mosen, 1987 ; Deltour and Motte, 1990 ; Risueno and Testillano, 1994 ; Shaw et al., 1995 ; Medina et al., 2000), le terme de centre fibrillaire n'est entré en vigueur que depuis quelque quinze ans (Jordan et al., 1982 ; Risueno et al., 1982). Auparavant, les auteurs parlaient de "lacunes", "zones L", "matériel fibrillaire pâle" et autres (Chouinard, 1970 ; Jordan and Chapman, 1971, 1973 ; Lafontaine and Lord, 1973 ; Chouinard, 1974 ; Esponda and Gimenez-Martin, 1974 ; Lafontaine and Lord, 1974 ; Esponda and Gimenez-Martin, 1975 ; Jordan and Luck, 1976). Pour Chouinard (1975), "l'espace lacunaire" ou "lacune" résulterait de sections transversales ou obliques dans un canal convoluté renfermant la chromatine du NOR.

Néanmoins, ces centres fibrillaires ne sont pas conformes à ceux rencontrés dans les nucléoles des noyaux des cellules des Mammifères. Ils sont enclavés dans une grande masse de fibrilles sans aucun contact avec les granules. Deux formes structurelles les particularisent : les centres fibrillaires homogènes généralement petits et nombreux, et, les centres fibrillaires hétérogènes, larges, plus rares et incluant des mottes de chromatine (Risueno et al., 1982 ; Risueno and Medina, 1986). L'altérité morphologique serait tributaire du degré d'activité des gènes ribosomiques. Dans les nucléoles des noyaux des cellules de Mammifères, les centres fibrillaires n'intègrent jamais de chromatine condensée en eux, même en période de latence, et seule une mince couronne discontinue de fibrilles denses les cerne à leurs confins.

La contradiction ne réside pas uniquement en la disparité morphologique des centres fibrillaires, mais également en leur composition distincte. Au contraire des centres fibrillaires des noyaux des cellules animales, ils ne semblent pas contenir de protéines argyrophiles (Motte et al., 1988 ; Moreno et al., 1989a, 1989b, 1990 ; Tremblay et al., 1992), d'ARN (Sato, 1990, 1992 ; Tremblay et al., 1992 ; Risueno and Testillano, 1994 ; Mena et al., 1994 ; Testillano et al., 1995), de facteur de

transcription tel l'UBF (Rodrigo et al., 1992) et, par autoradiographie, l'uridine ne paraît pas s'y incorporer, même à leur périphérie (Risueno et al., 1982 ; Deltour and Mosen, 1987 ; Motte, 1991).

Conduits par un certain nombre d'arguments qui s'étayaient mutuellement, la plupart des auteurs parviennent à la conclusion que la transcription des gènes ribosomiques s'opère au sein du constituant fibrillaire dense ; y sont présents de l'ADN (Martin et al., 1989 ; Tremblay et al., 1992 ; Risueno and Testillano, 1994), de l'ARN naissant (Risueno et al., 1982 ; Deltour and Mosen, 1987 ; Motte, 1991 ; Melcak et al., 1996 ; Thompson et al., 1997), des hybrides ADN/ARN (Risueno and Testillano, 1994 ; Testillano et al., 1994), de l'ARN, de l'ARN ribosomique (Olmedilla et al., 1993 ; Testillano et al., 1995 ; Bassy et al., 2000), des agents essentiels au déroulement de la transcription tels l'ARN polymérase I et l'UBF (Martin and Medina, 1991 ; Rodrigo et al., 1992 ; de Carcer and Medina, 1999) ainsi que des protéines argyrophiles (Barlow, 1983 ; Medina et al., 1983 ; Sato, 1985 ; Motte et al., 1988 ; Moreno et al., 1989a, 1989b, 1990 ; Sato, 1990 ; Motte, 1991 ; Sato, 1992 ; Martin et al., 1992 ; Tremblay et al., 1992).

A l'énoncé de ces opinions, nous estimons que les preuves en faveur d'une tricompartimentation des nucléoles des noyaux des cellules des Plantes manquent de consistance. Ne souhaitant toutefois pas mettre en doute sans fondement une conception généralement admise, nous avons travaillé sur les cellules méristématiques des racines de *Zea mays* au cours de leur germination dans des conditions optimales ou freinées dans leur développement si placées à basse température, ainsi que sur des cellules méristématiques des bourgeons cotylédonaire de *Pisum sativum* (figure 20) durant leur croissance (Mineur et al., 1998 ; Jennane et al., 1999, 2000).

Quel que soit le matériel végétal envisagé, nous observons dans le nucléole deux zones distinctes, une région fibrillaire argyrophile, piquée d'interstices plus ou moins fréquents, et une région granulaire. Mais singulièrement, nous ne voyons pas de centres fibrillaires caractérisés. Dans les nucléoles activés, l'ADN se distribue dans la zone fibrillaire et plus abondamment dans les interstices la parsemant. Dès inhibition de la transcription des gènes ribosomiques par le froid ou l'action de l'actinomycine D, l'ADN semble désert la région fibrillaire et se replier dans des mottes de chromatine dense émergeant dans les interstices. En fait, durant l'installation de l'inactivité des gènes ribosomiques, le nombre de petits interstices tend à diminuer tandis que certains s'élargissent et accueillent l'ADN, sorti de la zone fibrillaire et venu s'y condenser en petits amas. L'emploi de l'anticorps antifibrillaire fournit un marquage des fibrilles denses comme attendu, et n'implique pas les granules.

N'ayant recueilli aucun indice en faveur de l'existence d'un centre fibrillaire typé, nous rapprochons plus volontiers le nucléole du noyau des cellules végétales des nucléoles à deux compartiments, fréquents dans les noyaux des cellules animales.

2. 2. 3. Le nucléole dans le noyau de la Levure

Dans notre intention de mieux apprécier la complexité des relations entre la structure et la fonction des nucléoles des cellules d'Eucaryotes, l'existence des nucléoles à deux compartiments doit entrer en ligne de compte. A ce stade de notre analyse, il nous a paru pertinent de nous tourner vers un type d'organisme cellulaire plus simple, la Levure. Les Levures possèdent un génome de petite dimension sans intron et plusieurs systèmes de régulation de leurs gènes sont bien connus. Le niveau de spécialisation de leur nucléole est susceptible d'être plus bas, moins complexe, plus accessible et plus sensible à l'induction de modifications.

Les cytologistes sont peu enclins à étudier ce matériel, rebutés sans doute par la petite taille du noyau ou par l'obstacle qu'est la paroi, et, de ce fait, disposent de peu de renseignements tangibles sur le nucléole de la Levure. Pourtant, c'est un outil auquel les biochimistes accordent depuis longtemps leur préférence. Leur connaissance de la biogenèse des ribosomes dans la Levure est très approfondie (Mélèse and Xue, 1995 ; Lafontaine and Tollervey, 1998 ; Venema and Tollervey, 1999 ; Dechampsme et al., 1999), ils ont déterminé la nature de multiples protéines concernées par le processus et identifié le rôle qu'elles y jouaient (Clark et al., 1990 ; Aris and Blobel, 1991 ; Tollervey et al., 1991 ; Oakes et al., 1993 ; Ripmaster et al., 1993 ; Tollervey et al., 1993 ; Sun and Woolford, 1994 ; Berges et al., 1994 ; Lafontaine et al., 1995 ; Bousquet-Antonelli et al., 1997 ; Gautier et al., 1997 ; Lafontaine et al., 1998 ; Lafontaine and Tollervey, 1999 ; Oakes et al., 1999). La provocation de mutations par le placement de certains gènes dans des sites du génome sélectionnés par des recombinaisons homologues ainsi que l'isolement des mutants ne présentent guère de difficultés. Par conséquent, il existe déjà un grand nombre de mutants dans lesquels un paramètre strictement défini perturbe la biogenèse des ribosomes. Leur étude cytologique pourrait résoudre certaines énigmes et nous apporter des solutions en donnant des réponses au cas par cas.

Le nucléole de la Levure (figure 21) occupe quasi cinquante pour cent du volume nucléaire total et est structuré en cordons de fibrilles mélangés à des granules, évoquant la forme d'un croissant toujours accolé à l'enveloppe nucléaire (Molenaar et al., 1970 ; Mc Cully and Robinow, 1971 ; Sillevs-Smitt et al., 1973 ; Erard and Barker, 1985 ; Hirano et al., 1989 ; Potashkin et al., 1990 ; Dvorkin et al., 1991).

Récemment, la pratique de la cryotomie a fait apparaître des centres fibrillaires, morphologiquement comparables à ceux rencontrés dans les nucléoles des cellules de Mammifères (Léger-Sylvestre et al., 1997a, 1997b, 1999). Toutefois, la richesse en ADN ribosomique démontrée par hybridation *in situ* au niveau ultrastructural (Léger-Sylvestre et al., 1997b, 1999) et l'absence d'ARN polymérase I et d'ARN ribosomique dans ces soi-disant centres fibrillaires (Léger-Sylvestre et al., 1997b, 1999) déconcertent quelque peu. Résultat plus étonnant encore, ces structures disparaissent indubitablement lorsque les gènes ribosomiques du génome sont remplacés par un plasmide contenant les gènes ribosomiques (Trumtel et al., 2000).

Quant à nous, sur certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* et sur une souche de *Pichia pastoris*, nous ne trouvons aucun critère inaliénable de l'existence d'un centre fibrillaire typique (Verheggen et al., 2001). Dans le nucléole, nous distinguons une zone fibrillaire argyrophile contenant de l'ADN, imbriquée dans une zone granulaire plus périphérique, et, curieusement, pas de chromatine condensée, ni associée au nucléole, ni, en outre, implantée ailleurs dans le noyau. Toutefois, l'incubation dans une solution molaire en sorbitol produit une condensation de l'ADN et des petites mottes prennent forme dans des interstices proches de la région fibrillaire parallèlement au façonnement de plus gros blocs, mais ceux-là extranucléolaires.

A la lumière de nos observations, nous tirons la conclusion que le nucléole de la Levure ne comporte clairement que deux zones et que les centres fibrillaires, prétendus tels, équivaldraient à des interstices englobant la fraction intranucléolaire du chromosome porteur du NOR.

Dans notre étude préliminaire de certains mutants*, l'inhibition de la synthèse de certaines protéines vitales pour la biogenèse des ribosomes (Nop1, Nop56 et Nop58) nous offre une image peu ordinaire et totalement dissemblable de celles rencontrées dans les nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères, placés dans des circonstances suspendant le processus d'élaboration des ribosomes. Nous assistons à une disparition progressive mais totale des fibrilles et des granules ; tous deux s'effacent ne laissant à la place qu'une empreinte de territoire nucléolaire.

2. 2. 4. Discussion partielle

La majorité des travaux sur le nucléole se sont essentiellement focalisés sur celui de noyaux de cellules de Mammifères pour de simples raisons de commodité. Effectivement, il existe un grand nombre de souches cellulaires d'origine mammalienne, disponibles et aisément cultivables dans des milieux standardisés. Naturellement, le chercheur opte délibérément pour un matériel accessible, reproductible et propice à l'application en médecine humaine.

Le plus souvent, les auteurs n'excluent pas les nucléoles à deux compartiments de l'argumentation de leurs résultats mais les écartent de leurs conclusions et ne les répercutent jamais dans les généralisations ; par extension, ceux-ci deviennent une situation inaccoutumée dont, pourtant, les exemples fourmillent (tableau II). Ces nucléoles sont constitués de deux zones structurales distinctes dans les noyaux de la Levure, de certaines cellules animales non mammaliennes ou de cellules de Plantes supérieures (Thiry et al., 1991b ; Thiry et al., 1993 ; Thiry and Goessens, 1996 ; Mineur et al., 1998 ; Jennane et al., 1999, 2000 ; Verheggen et al., 2001).

A dessein, nous nous sommes attaché à réunir des informations sur ces nucléoles ; nous avons sélectionné quelques cas représentatifs de nucléoles chromosomiques et d'un extrachromosomique. A l'appui de nos expériences, la conclusion s'impose que quels que soient le contexte physiologique et la marche suivie pour préparer le matériel biologique, il nous a été impossible de démasquer un centre fibrillaire. Pourtant, la répartition hétérogène des protéines argyrophiles, observée dans la zone fibrillaire des nucléoles de Sf9, présageait d'une différenciation éventuellement cachée de la structure sous-jacente (Thiry et al., 1991b).

Quant aux composants des nucléoles des noyaux des cellules de Mammifères décelés habituellement dans leurs centres fibrillaires ou propres à ceux-ci (figure 22), tel l'exemple de l'ADN ribosomique, ils se rencontrent dans la zone fibrillaire des nucléoles à deux compartiments, mêlés à des indicateurs intrinsèques du constituant fibrillaire dense des nucléoles des noyaux de cellules de Mammifères, telle la fibrillarine (Thiry et al., 1991b ; Thiry et al., 1993 ; Thiry and Goessens, 1996 ; Mineur et al., 1998).

L'absence de centre fibrillaire apparent dans les nucléoles des noyaux des cellules eucaryotes étudiées ne semble pourtant entraver en rien le mécanisme de production des

*Souches employées :

YDL401, génotype : Mat a, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, trp1, gal2, gal Δ 108, ura3-52 (Lafontaine et Tollervey, 1996)

YDL522-17, génotype : comme YDL401 mais HIS3 :: GAL10 :: NOP58 (Lafontaine et Tollervey, 1999)

YDL527-1, génotype : comme YDL401 mais HIS3 :: GAL10 :: NOP56 (Lafontaine et Tollervey, 2000)

D255, génotype : BWG1-7A (Mat a, ura3-52, leu2-3, 112, adel-100, his4-519), mais URA3pGAL10 :: NOP1Gal :: Nop1 (Schimmang et al., 1989)

ribosomes. En réalité, ces nucléoles se dispensent de cet attribut en tant que structure distincte, ils ont un "centre fibrillaire" fondu dans l'unique zone fibrillaire les caractérisant. Leur comportement reste typique des besoins cellulaires et de leur environnement, entraînant le maintien des modalités inhérentes à leur activité spécifique d'élaboration des ribosomes.

Dès ralentissement de l'activité des gènes ribosomiques, les nucléoles des noyaux des ovocytes chez les Poissons, qui ont la faculté de développer des nucléoles extrachromosomiques, maîtrisent l'excès des gènes ribosomiques devenus inutiles en les évacuant hors de la zone fibrillaire.

En phase quiescente, les nucléoles des Plantes véhiculent les gènes ribosomiques, devenus excédentaires, hors de la zone fibrillaire dans des vacuoles où ils se rassemblent et forment des mottes de chromatine condensée (**Mineur et al., 1998**).

En période d'inactivité transcriptionnelle, les noyaux des cellules Sf9 conservent de l'ADN dans la zone fibrillaire de leur nucléole, à l'image des noyaux des cellules de Mammifères dans le centre fibrillaire de leur nucléole (**Mikhaylova et al., 1996 ; Thiry et al., 1997**).

De ces constatations, nous extrapolons que la zone fibrillaire des nucléoles à deux compartiments est l'égale, mais sous forme unie, des structures solidaires (centre fibrillaire et fibrilles denses) des nucléoles à trois compartiments ; elle est riche des mêmes molécules et endosse les mêmes rôles.

Par opposition, nous voyons que, au stade métaphase, le NOR, l'équivalent du centre fibrillaire dans le nucléole du noyau de la cellule en interphase (**Goessens et al., 1987 ; Ploton et al., 1987**), est pareil tant dans les noyaux des cellules dont le nucléole compte trois compartiments que dans celles dont le nucléole se borne à deux compartiments (**Thiry et al., 1991b ; Héliot et al., 1997**). Cette donnée plaide en faveur d'une ubiquité de cette structure dans les cellules d'Eucaryotes sous quelque forme que se reconstruise leur nucléole après suspension de son activité.

Ce résultat acquis balaie tout doute qui subsisterait quant à une responsabilité fonctionnelle à la disparité morphologique affectant les deux types de nucléoles. Nous croyons que cette absence de centre fibrillaire différencié prendrait sa cause ailleurs.

3. CONSIDERATIONS GENERALES

Pourquoi seul le matériel fibrillaire des nucléoles des noyaux des cellules des Eucaryotes supérieurs se subdivise-t-il en un centre fibrillaire et des fibrilles denses, et non celui des noyaux des cellules des Eucaryotes inférieurs?

Quelle est l'origine du centre fibrillaire? Quelle en est la substance? Quelle en est l'utilité? Quelle en est la nécessité? Quelle en est la pérennité? Quelle en est l'indisponibilité?

Nos résultats joints à ceux de la littérature attestent de la symbiose fonctionnelle des centres fibrillaires et des fibrilles denses dans les nucléoles à trois compartiments. Par leur alliance, ils portent le gène ribosomique. A leur niveau, le centre fibrillaire est le moteur de la transcription des gènes ribosomiques. Il conditionne, arme et enclenche la mise en route du processus qui a lieu à son pourtour. A sa frontière, les ARN pénètrent le constituant fibrillaire dense où ils s'y allongent et poursuivent leur maturation.

La lecture du tableau III révèle que les ressources conjuguées des centres fibrillaires et des fibrilles denses des nucléoles à trois compartiments égalent celles de la zone fibrillaire des nucléoles à deux compartiments. Cette constatation suppose que l'unité fonctionnelle constituée par les fibrilles denses et le centre fibrillaire des nucléoles à trois compartiments s'identifie à celle formée par la seule zone fibrillaire des nucléoles à deux compartiments.

Soit tout, soit une partie du centre fibrillaire perdurerait tout au long de la mitose dans le NOR ; cette hypothèse est fondée sur l'observation de similarités morphologiques et sur la présence de protéines argyrophiles associées à des éléments nécessaires au déroulement de la transcription des gènes ribosomiques tels l'ARN polymérase I, l'ADN topoisomérase I et l'UBF. Or, cette théorie inclut les nucléoles à deux compartiments. En effet, un NOR parfaitement identique (structure et composition), devient visible dans une cellule Sf9 au stade métaphase (Thiry et al., 1991b). Ayant engrangé tous les accessoires utiles à l'entreprise de la transcription des gènes ribosomiques, le centre fibrillaire des nucléoles à trois compartiments ne se désintègre pas au cours de la mitose, au contraire des constituants fibrillaire dense et granulaire ; probablement, pour les mêmes raisons, un reliquat suffisamment substantiel du bagage indispensable à la transcription des gènes ribosomiques s'extrait de la zone fibrillaire des nucléoles à deux compartiments, se concentre et devient distinct, accolé à un chromosome durant la mitose.

Cette transmission du gène ribosomique, équipé du matériel adéquat à sa transcription, d'une cellule à l'autre a le pouvoir de le maintenir réactionnel d'une génération à la suivante. Ne se détruisant pas lors de son inactivité, il s'assurerait d'une remise en fonction rapide. Par conséquent, le centre fibrillaire, individualisé ou non dans le nucléole, existe dans toute cellule eucaryote sous la forme du NOR et ce tout au long de sa vie.

La différenciation de la partie fibrillaire du nucléole en deux zones suppose une composition différente, mais implique forcément des interactions profondes dont la connaissance contribuerait à comprendre le pourquoi de ce clivage en un centre fibrillaire et une couronne de fibrilles denses. En résumé, le point commun à tout nucléole de noyau de toute cellule eucaryote est la possession de deux compartiments. Le centre fibrillaire est une "spécialité" du nucléole des noyaux des cellules des Vertébrés supérieurs.

Quelle que soit la cellule d'Eucaryote observée en fin du stade télophase, des corps prénucléolaires (PNB) s'expriment dans l'environnement des chromosomes. Ils contiennent des éléments communs impliqués dans la maturation des préARN ribosomiques (Ochs et al.,

1985 ; Benavente et al., 1987 ; Jimenez-Garcia et al., 1994 ; Dunder et al., 1997 ; Fomproix et al., 1998 ; Fomproix and Hernandez-Verdun, 1999 ; Mukharyamova et al., 1999 ; Savino et al., 1999 ; Verheggen et al., 2000), comparables à ceux rencontrés dans les constituants fibrillaire et granulaire des nucléoles actifs. Le matériel des PNB migre au voisinage des NOR (Dunder et al., 2000 ; Savino et al., 2001), prêt pour la coalescence avec ces derniers lors de la reprise de la transcription des gènes ribosomiques (Scheer and Benavente, 1990 ; Benavente, 1991 ; Dousset et al., 2000).

Le nucléole résulte, en fait, de l'intégration des ARN produits au niveau du NOR avec les molécules dispersées dès l'arrêt de synthèse ribonucléique au stade prophase et rassemblées en fin de télophase en PNB (Fan and Penman, 1971 ; Lepoint and Goessens, 1978 ; Morcillo and de la Torre, 1979 ; Hernandez-Verdun et al., 1980 ; de la Torre and Gimenez-Martin, 1982 ; Hügle et al., 1985a, 1985b ; Ochs et al., 1985 ; Sirri et al., 2000). Cet amalgame donne naissance à une structure finale comportant deux ou trois compartiments.

Il est indéniable qu'un ensemble de forces obéissant à quelques incitations inconnues aimantent, orientent, rapprochent et cimentent, selon un programme bien établi, toute la matière à l'origine de l'édification du nucléole. Un gène ribosomique peut engendrer à lui seul la formation d'un nucléole (Karpen et al., 1988 ; Warner, 1990) ; la transcription d'un gène ribosomique unique a la capacité potentielle de produire, organiser, concilier et maintenir les deux ou trois structures nucléolaires en un complexe stable. Les ARN naissants s'articulent donc au site de médiation qu'est la limite du centre fibrillaire pour s'associer à des protéines et organiser la couche de fibrilles denses (Scheer and Benavente, 1990). Le constituant fibrillaire dense s'attache intimement au centre fibrillaire en une structure support qui englobe les phénomènes transcriptionnel et post-transcriptionnel, qui en accumule les fruits et les distribue suivant une topologie spécifique préparatoire à la succession en cascade des étapes de la maturation et du clivage des ARN.

Le centre fibrillaire préside à la mise en marche de la biogenèse des ribosomes et régule le processus dans les nucléoles des noyaux des cellules des Eucaryotes supérieurs. Or il y a production de ribosomes même dans les cellules eucaryotes où les nucléoles ne comportent que deux compartiments. Ce cloisonnement plus poussé serait synonyme d'une efficacité plus performante ; cette efficacité n'étant, par ailleurs, qu'une acquisition tardive dans l'évolution.

Chez les Vertébrés supérieurs, les intercalaires intergéniques des gènes ribosomiques sont très longs (Hadjiolov, 1985) et la raison en est inconnue, tout comme leur utilité. Par contre, chez les Plantes, chez les Vertébrés inférieurs, chez les Invertébrés, ils sont de longueur égale ou inférieure à celle des intercalaires de l'unité de transcription (Hadjiolov, 1985). Nous imaginons que, pour qu'elle ne s'éparpille pas, l'unité de transcription est maintenue avec le matériel indispensable à la transcription, durant tout le cycle cellulaire, en un lieu consacré, le centre fibrillaire ; cet état de fait aurait le puissant avantage de la rapidité dans l'exécution de la production des ribosomes, dans son contrôle et sa capacité de rendement.

4. PERSPECTIVES

En dépit de leur responsabilité, commune à tous, d'assurer la production des ribosomes, les nucléoles affichent bien des facettes. Notre technique du suivi des ARN naissants (Thiry et al., 2000, 2001) sera une auxiliaire précieuse et bienvenue pour résoudre un certain nombre d'énigmes. Elle servira, dans un avenir proche, à nous ouvrir des portes dans la poursuite de notre recherche sur l'organisation morphofonctionnelle du nucléole des noyaux des cellules eucaryotes.

Nous avons essentiellement investigué un type de nucléole de noyau de cellule de Mammifères durant l'interphase, pourtant, nous sommes contraint de constater que l'agencement et l'étendue des compartiments nucléolaires sont inféodés à l'efficacité de la fonction de transcription des gènes ribosomiques. Suivant le degré de performance de l'activité cellulaire, nous sommes face à des nucléoles réticulés ou compacts. Comment s'installe ce genre de nucléole?

Dans un autre ordre d'idées, nous nous interrogeons sur le risque d'ingérence que pourrait exercer la réplication de l'ADN sur l'aspect du nucléole durant la phase S. L'interphase se scinde en différentes phases : G1, S et G2 ; mais serait-il possible de discriminer ces trois étapes? Nous aborderons le problème par l'étude de la distribution de l'ADN ribosomique et de l'ARN polymérase I.

Nous souhaiterions, par ailleurs, détailler la progression des préribosomes dans le constituant fibrillaire dense. Sous une seule forme structurale, les fibrilles denses abritent la maturation post-transcriptionnelle des ARN, leur assemblage avec l'ARN ribosomique 5S et avec des protéines ribosomiques et non ribosomiques. La localisation d'intervenants dans ces événements tels des protéines et des petits ARN nucléolaires impliqués dans les étapes post-transcriptionnelles s'enchaînant dans le constituant fibrillaire dense voire dans le granulaire nous éclairerait sur la relation entre la structure et la fonction à leur niveau.

Nous ne connaissons pas encore le cheminement des ARN depuis le constituant granulaire du nucléole, la route empruntée et la forme revêtue pour quitter le nucléole et gagner le cytoplasme. Les préribosomes pourraient diffuser librement dans le nucléoplasme, ou suivre un parcours significatif, ou encore, transiter par des structures nucléaires. Nous envisageons de pister *in vivo* l'exportation des préribosomes en microscopie confocale. Nous substituerons au bromouridine triphosphate de l'uridine triphosphate marquée par une substance fluorescente et nous filmerons le déplacement de cette balise dans la cellule.

Nous avons jeté les premiers jalons de l'étude des nucléoles à deux compartiments dans le noyau de la Levure. Cette cellule est le seul modèle dans lequel il est facile d'introduire un élément modifié entraînant une répercussion identifiable. Nous lui adapterons tout le bagage immunocytologique et cytochimique à notre portée pour comparer systématiquement souche sauvage et mutants.

Dans notre démarche pour cerner le problème du centre fibrillaire, une protéine argyrophile caractéristique et spécifique de ce dernier avait retenu notre attention. Intéressé par cette protéine, nous avons contribué au développement d'une méthode d'isolement des nucléoles préservant leurs centres fibrillaires (Vandelaer et al., 1996). En plus des protéines argyrophiles connues, C23 et B23, nous distinguons une troisième non répertoriée de ± 125

kD (Vandelaer et al., 1999). Nous avons pu mettre en corrélation la présence de la protéine colorée par l'argent sur "western blot" avec celle présente dans un centre fibrillaire de nucléole isolé. Ce résultat a une valeur d'autant moins négligeable qu'il pourrait avoir un impact sur le pronostic du cancer. En effet, les pathologistes usent fréquemment de la technique cytochimique des protéines argyrophiles comme indicateur pronostique du cancer. Quoique étrangère à notre préoccupation première, le développement d'une approche immunocytologique de détection de la protéine après purification serait susceptible d'optimiser les moyens pronostiques dans un domaine où la demande est sensible.

Nous pensons que l'utilisation des techniques que nous avons mises au point pourrait contribuer avec succès à caractériser des structures nucléaires mal connues comme les grains interchromatiniens, périchromatiniens et les corps pelotonnés.

Enfin, la participation du nucléole à d'autres aspects de l'expression des gènes ouvre une perspective plus large, plus radicalement nouvelle à son étude (Pederson, 1998a ; Jacobson and Pederson, 1998 ; Pederson and Politz, 2000 ; Ko et al., 2000 ; Olson et al., 2000 ; Politz et al., 2000 ; Maraia, 2001 ; Grosshans et al., 2001). Effectivement, des travaux récents suggèrent que le nucléole interviendrait dans des fonctions autres mais tout aussi primordiales que celle d'élaborer les ribosomes. Des molécules siégeant en son endroit participeraient à la maturation et au transport de certains ARN messagers (Potashkin et al., 1990 ; Bond and Wold, 1993 ; Kadowaki et al., 1994a, 1994b ; Schneider et al., 1995 ; Tani et al., 1995 ; Pederson, 1998a), à la maturation de l'ARN de la télomérase (Kennedy et al., 1997 ; Sinclair and Guarente, 1997 ; Sinclair et al., 1997), de l'ARN de transfert (Jacobson et al., 1997 ; Bertrand et al., 1998 ; Jarrous et al., 1999 ; Tolerico et al., 1999), du petit ARN nucléaire U6 (Ganot et al., 1999 ; Weinstein and Steitz, 1999 ; Lange and Gerbi, 2000). Le nucléole jouerait également un rôle important dans le contrôle de l'activité des régulateurs du cycle cellulaire (Pederson, 1998b ; Cockell and Gasser, 1999 ; Garcia and Pillus, 1999 ; Visintin and Amon, 2000).

5. BIBLIOGRAPHIE

5.1. Liste des publications personnelles

- Cheutin T, Vandelaer M, Kaplan H, Beorchia A, O'Donohue MF, Defève B, Ploton D, Thiry M. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. Soumis 2001.
- Compère P, Bouchtia H, Thiry M, Goffinet G. "Exolysosomes," enzyme-containing vesicles in the ecdysial space of molting crabs. *J Struct Biol* 1997; 119: 247-259.
- Derenzini M, Thiry M, Goessens G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1237-1256.
- Gilles R, Belkhir M, Compère P, Libioule C, Thiry M. Effect of high osmolarity acclimation on tolerance to hyperosmotic shocks in L929 cultured cells. *Tissue Cell* 1995; 27: 679-687.
- Goessens G, Thiry M, Lepoint A. Relations between nucleoli and nucleolus-organizing regions during the cell cycle. In : *Chromosomes Today*. Stahl A, Luciani J, Vagner-Capodano A, eds; Allen and Unwin : London 1987; 9: 259-271.
- Héliot L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia A, Doco-Fenzy M, Menager M, Thiry M, O'Donohue MF, Ploton D. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 2199-2216.
- Jennane A, Thiry M, Diouri M, Goessens G. The fate of the nucleolar vacuole during the resumption of the cell cycle in pea cotyledonary buds. *Protoplasma* 2000; 210: 172-178.
- Jennane A, Thiry M, Goessens G. Identification of coiled body-like structures in meristematic cells of *Pisum sativum* cotyledonary buds. *Chromosoma* 1999; 108: 132-142.
- Mikhaylova VT, Thiry M, Stephanova E, Goessens G, Markov DV. Localization of nucleic acids in hepatocyte nucleoli of rats upon D- galactosamine-induced block of transcription. *Exp Cell Res* 1996; 225: 389-398.
- Mineur P, Jennane A, Thiry M, Deltour R, Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress. *J Struct Biol* 1998; 123: 199-210.
- Ploton D, Thiry M, Menager M, Lepoint A, Adnet JJ, Goessens G. Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. *Chromosoma* 1987; 95: 95-107.
- Scheer U, Thiry M, Goessens G. Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol* 1993; 3 : 236-241.
- Seither P, Iben S, Thiry M, Grummt I. PAF67, a novel protein that is associated with the initiation-competent form of RNA polymerase I. *Biol Chem* 2001; 382: 1163-1170.
- Thiry M, Lepoint A, Goessens G. Re-evaluation of the site of transcription in Ehrlich tumour cell nucleoli. *Biol Cell* 1985; 54: 57-64.
- Thiry M, Goessens G. Ultrastructural study of the relationships between the various nucleolar components in Ehrlich tumour and HEP-2 cell nucleoli after acetylation. *Exp Cell Res* 1986; 164: 232-242.

- Thiry M. Study of RNA distribution in the nucleolar components of Ehrlich cell using RNase-gold method. *Histochemistry* 1988a; 89: 231-236.
- Thiry M. Immunoelectron microscope localization of bromodeoxyuridine incorporated into DNA of Ehrlich tumor cell nucleoli. *Exp Cell Res* 1988b; 179: 204-213.
- Thiry M, Dombrowicz D. Anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody: an alternative tool for the identification of replicated DNA at the electron microscope level. *Biol Cell* 1988; 62 : 99-102.
- Thiry M, Scheer U, Goessens G. Localization of DNA within Ehrlich tumour cell nucleoli by immunoelectron microscopy. *Biol Cell* 1988; 63: 27-34.
- Thiry M, Scheer U, Goessens G. Immunoelectron microscopic study of nucleolar DNA during mitosis in Ehrlich tumor cells. *Eur J Cell Biol* 1988; 47: 346-357.
- Thiry M, Muller S. Ultrastructural distribution of histones within Ehrlich tumor cell nucleoli: a cytochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 853-862.
- Thiry M, Thiry-Blaise L. *In situ* hybridization at the electron microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. *Eur J Cell Biol* 1989; 50: 235-243.
- Thiry M. DNase I-sensitive sites within the nuclear architecture visualized by immunoelectron microscopy. *DNA Cell Biol* 1991a; 10: 169-180.
- Thiry M. *In situ* nick translation at the electron microscopic level: a tool for studying the location of DNase I-sensitive regions within the cell. *J Histochem Cytochem* 1991b; 39: 871-874.
- Thiry M, Goessens G. Distinguishing the sites of pre-rRNA synthesis and accumulation in Ehrlich tumor cell nucleoli. *J Cell Sci* 1991; 99 (Pt 4): 759-767.
- Thiry M, Scheer U, Goessens G. Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and *in situ* hybridization at the electron microscopic level. *Electron Microsc Rev* 1991a; 4: 85-110.
- Thiry M, Schoonbroodt S, Goessens G. Cytochemical distinction of various nucleolar components in insect cells. *Biol Cell* 1991b; 72: 133-140.
- Thiry M, Thiry-Blaise L. Locating transcribed and non-transcribed rDNA spacer sequences within the nucleolus by *in situ* hybridization and immunoelectron microscopy. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 11-15.
- Thiry M. Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non-isotopic nucleotide analogues. *J Histochem Cytochem* 1992a; 40: 411-419.
- Thiry M. Ultrastructural detection of DNA within the nucleolus by sensitive molecular immunocytochemistry. *Exp Cell Res* 1992b; 200: 135-144.
- Thiry M. New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by *in situ* molecular immunocytochemistry. *Nucleic Acids Res* 1992c; 20: 6195-6200.
- Thiry M, Goessens G. Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located? *Exp Cell Res* 1992a; 200: 1-4.

- Thiry M, Goessens G. Location of DNA within the nucleolus of rat oocytes during the early stages of follicular growth. *Int J Dev Biol* 1992b; 36: 139-142.
- Thiry M. Immunodetection of RNA on ultra-thin sections incubated with polyadenylate nucleotidyl transferase. *J Histochem Cytochem* 1993a; 41: 657-665.
- Thiry M. Ultrastructural distribution of DNA and RNA within the nucleolus of human Sertoli cells as seen by molecular immunocytochemistry. *J Cell Sci* 1993b; 105 (Pt 1): 33-39.
- Thiry M. Differential location of nucleic acids within interchromatin granule clusters. *Eur J Cell Biol* 1993c; 62: 259-269.
- Thiry M, Ploton D, Menager M, Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within the nucleolus of various animal cell lines or tissues revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Cell Tissue Res* 1993; 271: 33-45.
- Thiry M. Cytochemical and immunocytochemical study of coiled bodies in different cultured cell lines. *Chromosoma* 1994; 103: 268-276.
- Thiry M. Nucleic acid compartmentalization within the cell nucleus by in situ transferase-immunogold techniques. *Microsc Res Tech* 1995a; 31: 4-21.
- Thiry M. Robert Feulgen Prize Lecture 1995. New approaches to *in situ* detection of nucleic acids. *Histochem Cell Biol* 1995b; 104: 81-95.
- Thiry M. Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* 1995c; 68: 14-24.
- Thiry M, Puvion-Dutilleul F. Differential distribution of single-stranded DNA, double-stranded DNA, and RNA in adenovirus-induced intranuclear regions of HeLa cells. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 749-759.
- Thiry M, Goessens G. The nucleolus during the cell cycle. RG Landes Company, Chapman and Hall: New York 1996; 1-144.
- Thiry M, Jamison JM, Gilloteaux J, Summers JL, Goessens G. Ultrastructural nucleolar alterations induced by an ametantrone/polyr(A- U) complex. *Exp Cell Res* 1997; 236: 275-284.
- Thiry M, Daneholt B. Evaluation of the sensitivity of the terminal deoxynucleotidyl transferase-immunogold technique on Balbani ring genes. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 345-351.
- Thiry M. Ultrastructural methods for nucleic acid detection by immunocytology. *Prog Histochem Cytochem* 1999; 34: 87-159.
- 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.
- Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Ploton D. Pictures in cell biology. Spatial dynamics of rRNAs. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 147.
- Vandelaer M, Thiry M, Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within the ring-shaped nucleolus of human resting T lymphocytes. *Exp Cell Res* 1993; 205: 430-432.
- Vandelaer M, Thiry M, Goessens G. Isolation of nucleoli from ELT cells: a quick new method that preserves morphological integrity and high transcriptional activity. *Exp Cell Res* 1996; 228: 125-131.

- Vandelaer M, Thiry M. The phosphoprotein pp135 is an essential constituent of the fibrillar components of nucleoli and of coiled bodies. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 169-177.
- Vandelaer M, Thiry M, Goessens G. AgNOR proteins from morphologically intact isolated nucleoli. *Life Sci* 1999; 64: 2039-2047.
- Verheggen C, Mouaikel J, Thiry M, Blanchard JM, Tollervey D, Bordonne R, Lafontaine DL, Bertrand E. Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J* 2001; 20: 5480-5490.
- Zatsepina OV, Dudnic OA, Todorov IT, Thiry M, Spring H, Trendelenburg MF. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma* 1997a; 105: 418-430.
- Zatsepina OV, Dudnic OA, Chentsov YS, Thiry M, Spring H, Trendelenburg MF. Reassembly of functional nucleoli following *in situ* unraveling by low- ionic-strength treatment of cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 1997b; 233: 155-168.

5.2. Références

- Acs G, Reich E, Mori M. Biological and biochemical properties of the analogue antibiotic tubercidin. *Biochemistry* 1964; 52: 493-501.
- Allmang C, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1684-1691.
- Angelier N, Lacroix JC. Transcription complexes with nucleolar and chromosomal origins in oocytes of *Pleurodeles waltlii* and *Pleurodeles poireti* (amphibia, urodela). *Chromosoma* 1975; 51: 323-335.
- Aris JP, Blobel G. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 931-935.
- Azevedo C, Coimbra A. Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Biol Cell* 1980; 38: 43-48.
- Azevedo C, Castilho F, Coimbra A. Fine structure and cytochemistry of the oocyte nucleolus in the mollusk *Helcion pellucidus* (*Prosobranchia*). *J Ultrastruc Res* 1984; 89: 1-11.
- 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 (Pt 2): 463-475.
- Bachelier JP, Nicoloso M, Zalta JP. Nucleolar chromatin in Chinese hamster ovary cells. Topographical distribution of ribosomal DNA sequences and isolation of ribosomal transcription complexes. *Eur J Biochem* 1977; 79: 23-32.
- Bachelier JP, Cavaille J. Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 257-261.
- Barlow PW. Nucleolus-associated bodies (karyosomes) in dividing and differentiating plant cells. *Protoplasma* 1983; 115: 1-10.
- Bassleer R, Lepoint A, De Paermentier F, Goessens G. Modifications cytologiques et cytochimiques provoquées par la tubercidine dans des cellules normales ou cancéreuses cultivées *in vitro*. *Biol Cell* 1976; 25: 33-38.
- Bassy O, Jimenez-Garcia LF, Echeverria OM, Vazquez-Nin GH, Diaz de la Espina SM. High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by *in situ* hybridization. *Biol Cell* 2000; 92: 59-70.
- Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14173-14178.
- Bell SP, Pikaard CS, Reeder RH, Tjian R. Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell* 1989; 59: 489-497.
- Bell SP, Jantzen HM, Tjian R. Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev* 1990; 4: 943-954.
- Bellard M, Kuo MT, Dretzen G, Chambon P. Differential nuclease sensitivity of the ovalbumin and beta-globin chromatin regions in erythrocytes and oviduct cells of laying hen. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 2737-2750.

- Benavente R, Rose KM, Reimer G, Hogle-Dorr B, Scheer U. Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 1483-1491.
- Bendayan M. Electron microscopical localization of nucleic acids by means of nuclease--gold complexes. *Histochem J* 1981; 13: 699-710.
- Bendayan M. Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry : A new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *J Electron Microscop Techn* 1984; 1: 349-372.
- Berges T, Petfalski E, Tollervey D, Hurt EC. Synthetic lethality with fibrillarin identifies NOP77p, a nucleolar protein required for pre-rRNA processing and modification. *EMBO J* 1994; 13: 3136-3148.
- Bernhard W, Frayssinet C, Lafarge C, Le Breton E. Lésions nucléolaires provoquées par l'aflatoxine dans les cellules hépatiques du rat. *C R Acad Sci Paris* 1965; 261: 1785-1788.
- Bertaux O, Moyne G, Lafarge-Frayssinet Ch, Valencia R. The nucleus of *Euglena H*. Ultrastructural modifications of the nucleus of B12-deprived *Euglena gracilis* Z. *J Ultrastruct Res* 1978; 62: 251-269.
- Bertout M. Ultrastructural cytochemistry of NOR in oocytes of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). *Biol Cell* 1984; 52: 35-42.
- Bertrand E, Houser-Scott F, Kendall A, Singer RH, Engelke DR. Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev* 1998; 12: 2463-2468.
- Besse S, Puvion-Dutilleul F. Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* 1996; 71: 33-44.
- Bloch A, Leonard R, Nichol C. On the mode of action of 7-deaza-adenosine (tubercidin). *Biochem Biophys Acta* 1967; 138: 10-25.
- Bloom KS, Anderson JN. Fractionation of hen oviduct chromatin into transcriptionally active and inactive regions after selective micrococcal nuclease digestion. *Cell* 1978; 15: 141-150.
- Bolla RI, Braaten DC, Shiomi Y, Hebert MB, Schlessinger D. Localization of specific rDNA spacer sequences to the mouse L-cell nucleolar matrix. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1287-1294.
- Boloukhere M. Ultrastructural localization of nucleolar organizers during oogenesis in *Xenopus laevis* using a silver technique. *J Cell Sci* 1984; 65: 73-93.
- Bond VC, Wold B. Nucleolar localization of myc transcripts. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3221-3230.
- Borovjagin AV, Gerbi SA. 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. *J Mol Biol* 1999; 286: 1347-1363.
- Bousquet-Antonelli C, Henry Y, G'elugne JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J* 1997; 16: 4770-4776.
- Bouteille M, Dupuy-Coin AM, Moyne G. Techniques of localization of proteins and nucleoproteins in the cell nucleus by high resolution autoradiography and cytochemistry. *Methods Enzymol* 1975; 40: 3-41.

- Bouteille M, Hernandez-Verdun D, Dupuy-Coin AM, Bourgeois CA. Nucleoli and nucleolar-related structures in normal, infected and drug-treated cells. In : The nucleolus. Jordan EG, Cullis CA, eds; Cambridge University Press : Cambridge 1982; 15: 179-211.
- Brown DD, Dawid IB. Specific gene amplification in oocytes. Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA. *Science* 1968; 160: 272-280.
- Busch H, Smetana K. The Nucleolus. Academic Press : New York, London 1970; 1-626.
- Cadwell C, Yoon HJ, Zebarjadian Y, Carbon J. The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6175-6183.
- Caratero C, Caratero A, Bes JC, Lepoint A, Goessens G, Planel H. Analyse cytochimique quantitative, ultrastructurale et autoradiographique des effets de l'irradiation ultraviolette chez *Tetrahymena pyriformis*. *Protistologica* 1984; 20: 235-246.
- Carosi C, Scaglia M, Filice G, Willaert E. An electron microscope study of *Naegleria jadini* nov. sp. (Willaert-Le Roy, 1973) in axenic "medium". The aneboid stage. *Protistologica* 1976; 12: 31-36.
- Carosi G, Scaglia M, Lanzarini P, Castelli F, Gatti S. Ultrastructure of *Naegleria australiensis* (pp-397 strains) with particular regard to pleomorphic cytoplasmic RER-associated inclusions. *Protistologica* 1986; 22: 169-174.
- Cave MD. Absence of rDNA amplification in the uninucleolate oocyte of the cockroach *Blattella germanica* (Orthoptera : Blattidae). *J Cell Biol* 1976; 71: 49-58.
- Chaly N, Lord A, Lafontaine JG. Nucleolar organization in the euglenoid *Astasia langra* as disclosed by selective staining, actinomycin D treatment and cold shock. *Can J Bot* 1979; 57: 2031-2043.
- 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.
- Cheniclet C, Bendayan M. Comparative pyrimidine- and purine-specific RNase-gold labeling on pancreatic acinar cells and isolated hepatocytes. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 551-562.
- Cheniclet C, Garzon S, Bendayan M. *In situ* detection of nucleic acids by the nuclease-gold method. In : Visualization of nucleic acids. Morel G, ed; CRC Press : Boca Raton, London, Tokyo 1995; 95-109.
- Chèvremont M, Baeckeland E. Etude histoautoradiographique de l'incorporation d'uridine tritiée en culture de tissus dans des fibroblastes normaux ou soumis à l'action de substances antimitotiques. *Arch Biol* 1961; 72: 461-484.
- Chooi WY, Leiby KR. An electron microscopic method for localization of ribosomal proteins during transcription of ribosomal DNA: a method for studying protein assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 4823-4827.
- Chouinard LA. Localization of intranucleolar DNA in root meristematic cells of *Allium cepa*. *J Cell Sci* 1970; 6: 73-85.
- Chouinard LA. An electron-microscope study of the intranucleolar chromatin in root meristematic cells of *Allium cepa*. *J Cell Sci* 1974; 15: 645-657.

- Chouinard LA. An electron-microscope study of the intranucleolar chromatin during nucleologenesis in root meristematic cells of *Allium cepa*. J Cell Sci 1975; 19: 85-101.
- Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L. The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 659-663.
- Clark MW, Yip ML, Campbell J, Abelson J. SSB-1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a nucleolar-specific, silver-binding protein that is associated with the snR10 and snR11 small nuclear RNAs. J Cell Biol 1990; 111: 1741-1751.
- Cockell MM, Gasser SM. The nucleolus: nucleolar space for RENT. Curr Biol 1999; 9: R575-R576.
- Cory S, Adams JM. A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes. Cell 1977; 11: 795-805.
- Dadoue JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. Ultrastructural localization of rDNA and rRNA by *in situ* hybridization in the nucleolus of human spermatids. Cell Tissue Res 1994; 278: 611-616.
- Das N. Chromosomal and nucleolar RNA synthesis in root tip during mitosis. Science 1963; 140: 1231-1233.
- Daskal Y. Drug effects on nucleolar and extranucleolar chromatin. In : Effects of drugs on the cell nucleus. Busch H, Croke S, Daskal Y, eds; Academic Press : New York, London 1979; 1: 107-124.
- de Carcer G, Medina FJ. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. J Struct Biol 1999; 128: 139-151.
- Dechampsme AM, Koroleva O, Léger-Silvestre I, Gas N, Camier S. Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre- rRNA processing pathway. J Cell Biol 1999; 145: 1369-1380.
- Dehan P, Goessens G. Etude ultrastructurale des modifications nucléolaires au cours du processus d'enkystement et de dékystement d'*Acenthamoela castellanii*. Biol Cell 1988; 63: 16a.
- de la Torre C, Gimenez-Martin G. The nucleolar cycle. In : The nucleolus. Jordan EG, Cullis CA, eds; Cambridge University Press : Cambridge 1982; 153-177.
- Deltour R, Mosen H. Proposals for the macromolecular organization of the higher plant nucleonema. Biol Cell 1987; 60: 75-86.
- Deltour R, Motte P. The nucleolonema of plant and animal cells: a comparison. Biol Cell 1990; 68: 5-11.
- Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Bouteille M. Visualization *in situ* of extended DNA filaments in nucleolar chromatin of rat hepatocytes. Exp Cell Res 1982; 141: 463-469.
- Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novello F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. J Ultrastruct Res 1983; 84: 161-172.
- Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Structure of ribosomal genes of mammalian cells *in situ*. Chromosoma 1987; 95: 63-70.
- Derenzini M, Farabegoli F, Trere D. Localization of DNA in the fibrillar components of the nucleolus: a cytochemical and morphometric study. J Histochem Cytochem 1993; 41: 829-836.

- 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.
- Dundr M, Meier UT, Lewis N, Rekosh D, Hammarskjold ML, Olson MO. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma* 1997; 105: 407-417.
- Dundr M, Misteli T, Olson MO. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 2000; 150: 433-446.
- Dupuy-Coin AM, Pebusque MJ, Seite R, Bouteille M. Localization of transcription in nucleoli of rat sympathetic neurons. A quantitative ultrastructural autoradiography study. *J Submicrosc Cytol* 1986; 18: 21-27.
- Dvorkin N, Clark MW, Hamkalo BA. Ultrastructural localization of nucleic acid sequences in *Saccharomyces cerevisiae* nucleoli. *Chromosoma* 1991; 100: 519-523.
- Elela SA, Igel H, Ares M, Jr. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 1996; 85: 115-124.
- Elgin SC. DNase I-hypersensitive sites of chromatin. *Cell* 1981; 27: 413-415.
- Elgin SC. The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J Biol Chem* 1988; 263: 19259-19262.
- Erard M, Barker DG. Electron microscopic studies of condensed mitotic chromosomes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 1985; 55: 27-34.
- Esponda P, Gimenez-Martin G. Cytochemical aspects of the nucleolar organizer in *Allium cepa* microspores. *Chromosoma* 1974; 45: 203-213.
- Esponda P, Gimenez-Martin G. Nucleolar organizer ultrastructure in *Allium cepa*. *Chromosoma* 1975; 52: 73-87.
- Evers R, Smid A, Rudloff U, Lottspeich F, Grummt I. Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *EMBO J* 1995; 14: 1248-1256.
- Fakan S, Hancock R. Localization of newly-synthesized DNA in a mammalian cell as visualized by high resolution autoradiography. *Exp Cell Res* 1974; 83: 95-102.
- Fakan S. High-resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mammalian cell nucleus. *J Microsc* 1976; 106: 159-171.
- Fakan S. High resolution autoradiographic studies on chromatin functions. In : *The Cell nucleus*. Busch H, ed; Academic Press : New York 1978; 5: 3-53.
- Fakan S. Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus. *Methods Achiev Exp Pathol* 1986; 12: 105-140.
- Fan H, Penman S. Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase arrested cells. *J Mol Biol* 1971; 59: 27-42.
- Favard-Soreno C. Evolution des structures nucléaires au cours de la phase d'accroissement cytoplasmique chez le grillon (Insecte, Orthoptère). *J Microsc* 1968; 7: 205-230.
- Feinendegen L, Bond V. Observations on nuclear RNA during mitosis in human cancer cells in culture (HeLa-S3), studied with tritiated cytidine. *Exp Cell Res* 1963; 30: 393-404.

- Fischer D, Weisenberger D, Scheer U. Assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma* 1991; 101: 133-140.
- Flickinger CJ. The fine structure of the nucleoli of normal and actinomycin D-treated *Amoeba proteus*. *J Ultrastruc Res* 1968; 23: 260-271.
- Foe VE. Modulation of ribosomal RNA synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: an electron microscopic study of the relationship between changes in chromatin structure and transcriptional activity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978; 42 Pt 2: 723-740.
- Fomproix N, Gébrane-Younes J, Hernandez-Verdun D. Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 3): 359-372.
- Fomproix N, Hernandez-Verdun D. Effects of anti-PM-ScI 100 (Rrp6p exonuclease) antibodies on prenucleolar body dynamics at the end of mitosis. *Exp Cell Res* 1999; 251: 452-464.
- Franke WW, Scheer U, Spring H, Trendelenburg M, Zentgraf. Organization of nucleolar chromatin. In : *The Cell nucleus*. Busch H, ed; Academic Press : New York 1979; 7: 49-95.
- Gall JG, MacGregor HC, Kidston ME. Gene amplification in oocytes of dytiscid water beetles. *Chromosoma* 1969; 26: 169-187.
- Ganot P, Jady BE, Bortolin ML, Darzacq X, Kiss T. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6906-6917.
- Garcia SN, Pillus L. Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 1999; 97: 825-828.
- Gautier T, Berges T, Tollervey D, Hurt E. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 7088-7098.
- Gébrane-Younès J, Fomproix N, Hernandez-Verdun D. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 19): 2429-2440.
- Géraud ML, Herzog M, Soyer-Gobillard MO. Nucleolar localization of rRNA coding sequences in *Prorocentrum micans* Ehr. (dinomastigote, kingdom Protoctist) by *in situ* hybridization. *Biosystems* 1991; 26: 61-74.
- Gerbi SA. Small nucleolar RNA. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 845-858.
- Ghosh S, Paweletz N. Localization of ribosomal cistrons at the ultrastructural level by *in situ* hybridization technique. *Cell Biol Int Rep* 1990; 14: 521-525.
- Gilbert N, Lucas L, Klein C, Menager M, Bonnet N, Ploton D. Three-dimensional co-location of RNA polymerase I and DNA during interphase and mitosis by confocal microscopy. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 1): 115-125.
- Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1998; 17: 1476-1486.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 6): 761-772.
- Goessens G. Fibrillary centers of the nucleoli of Ehrlich's tumor cells. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1973; 277: 325-327.

- Goessens G, Lepoint A. The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumour cells cultivated in vitro. *Exp Cell Res* 1974; 87: 63-72.
- Goessens G. Etude ultrastructurale des nucléoles au cours du cycle cellulaire. Une analyse cytologique et cytochimique réalisée dans des cellules normales ou cancéreuses. Thèse de doctorat ; Liège 1975.
- Goessens G. The nucleolar fibrillar centres in various cell types in vivo or in vitro. *Cell Tissue Res* 1976a; 173: 315-324.
- Goessens G. High resolution autoradiographic studies of ehrlich tumour cell nucleoli. Nucleolar labelling after [3H]actinomycin D binding to DNA or after [3H]TdR or [3H]uridine incorporation in nucleic acids. *Exp Cell Res* 1976b; 100: 88-94.
- Goessens G, Lepoint A. The nucleolus-organizing regions (NOR's): recent data and hypotheses. *Biol Cell* 1979; 35: 211-220.
- Goessens G. Relations between fibrillar centres and nucleolus-associated chromatin in Ehrlich tumour cells. *Cell Biol Int Rep* 1979; 3: 337-343.
- Goessens G. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 1984; 87: 107-158.
- Greco N, BussersJC, Goffinet G, Goessens G, Jeuniaux Ch. Origine des couches kystiques chez *Euplotes musicola*. *Ann Soc Roy Zool Belg* 1987; 117: 111.
- Grosshans H, Deinert K, Hurt E, Simos G. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p- mediated export. *J Cell Biol* 2001; 153: 745-762.
- Grummt I, Kuhn A, Bartsch I, Rosenbauer H. A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell* 1986; 47: 901-911.
- Grummt I. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999; 62: 109-154.
- Guddat U, Bakken AH, Pieler T. Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1990; 60: 619-628.
- Guldner HH, Szostecki C, Vosberg HP, Lakomek HJ, Penner E, Bautz FA. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I. *Chromosoma* 1986; 94: 132-138.
- Hadjiolov A. The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biol monographs*. Springer- verlag ; Wien, New York 1985; 12: 1-263.
- Hadjiolova K, Rose KM, Scheer U. Immunolocalization of nucleolar proteins after D-galactosamine-induced inhibition of transcription in rat hepatocytes. Maintenance of association of RNA polymerase I with inactivated nucleolar chromatin. *Exp Cell Res* 1986; 165: 481-493.
- Hernandez-Verdun D, Bouteille M. Nucleologenesi in chick erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. *J Ultrastruct Res* 1979; 69: 164-179.
- Hernandez-Verdun D, Hubert J, Bourgeois CA, Bouteille M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. *Chromosoma* 1980; 79: 349-362.
- Hernandez-Verdun D, Derenzini M, Bouteille M. The morphological relationship in electron microscopy between NOR- silver proteins and intranucleolar chromatin. *Chromosoma* 1982; 85: 461-473.

- Hernandez-Verdun D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Methods Achiev Exp Pathol* 1986; 12: 26-62.
- Hernandez-Verdun D. The nucleolus today. *J Cell Sci* 1991; 99 (Pt 3): 465-471.
- Hirano T, Konoha G, Toda T, Yanagida M. Essential roles of the RNA polymerase I largest subunit and DNA topoisomerases in the formation of fission yeast nucleolus. *J Biol Cell* 1989; 108: 243-253.
- Hozak P, Schöfer C, Sylvester J, Wachtler F. A study on nucleolar DNA: isolation of DNA from fibrillar components and ultrastructural localization of different DNA probes. *J Cell Sci* 1993; 104 (Pt 4): 1199-1205.
- Hubert J. Description, cytochemistry, and electron microscopic autoradiography of nucleolar granular spheres and micronucleoli of lizard (*Lacerta vivipara* Jacquin) pyriform cells. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1975; 280: 2555-2557.
- Hughes JM, Ares M, Jr. Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J* 1991; 10: 4231-4239.
- Hughes JM. Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *J Mol Biol* 1996; 259: 645-654.
- Hügler B, Hazan R, Scheer U, Franke WW. Localization of ribosomal protein S1 in the granular component of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis. *J Cell Biol* 1985a; 100: 873-886.
- Hügler B, Scheer U, Franke WW. Ribocharin: a nuclear Mr 40,000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit. *Cell* 1985b; 41: 615-627.
- Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 1993; 12: 1059-1065.
- Jacob J. An electron microscope autoradiographic study of initial synthesis of RNA in the nucleolus of *Smittia*. *Exp Cell Res* 1967; 48: 276-282.
- Jacob J, Gillies K, Macleod D, Jones K. Molecular hybridization of mouse satellite DNA-complementary RNA in ultrathin sections prepared for electron microscopy. *J Cell Sci* 1974; 14: 253-261.
- Jacobson MR, Cao LG, Wang YL, Pederson T. Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J Cell Biol* 1995; 131: 1649-1658.
- Jacobson MR, Cao LG, Taneja K, Singer RH, Wang YL, Pederson T. Nuclear domains of the RNA subunit of RNase P. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 7): 829-837.
- Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 1990; 344: 830-836.
- Jarrous N, Wolenski JS, Wesolowski D, Lee C, Altman S. Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P. *J Cell Biol* 1999; 146: 559-572.
- Jimenez-Garcia LF, Segura-Valdez ML, Ochs RL, Echeverria OM, Vazquez-Nin GH, Busch H. Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic *in situ* hybridization. *Exp Cell Res* 1993; 207: 220-225.

- Jimenez-Garcia LF, Segura-Valdez ML, Ochs RL, Rothblum LI, Hannan R, Spector DL. Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 955-966.
- Jordan EG, Chapman JM. Ultrastructure changes in the nucleoli of the Jerusalem artichoke (*Helthiantus tuberosus*) tuber dix. *J Exp Bot* 1971; 22: 627-634.
- Jordan EG, Chapman JM. Nucleolar and nuclear envelope ultrastructure in relation to cell activity in discs of carrot root. *J Exp Bot* 1973; 24: 197-209.
- Jordan EG, Luck BT. The nucleolus organizer and the synaptonemal complex in *Endymion non-scriptus* (L.). *J Cell Sci* 1976; 22: 75-86.
- Jordan EG, Bennett MD, Smith JB. Nucleolar organizers and fibrillar centers in *Triticum aestivum* L, cv Chinese Spring. *Chromosoma* 1982; 87: 447-459.
- Jordan E. At the heart of the nucleolus. *Nature* 1987; 329: 489-490.
- Jordan P, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M. In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol* 1996; 133: 225-234.
- Junera HR, Masson C, Geraud G, Suja J, Hernandez-Verdun D. Involvement of in situ conformation of ribosomal genes and selective distribution of upstream binding factor in rRNA transcription. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 145-156.
- Kadowaki T, Chen S, Hitomi M, Jacobs E, Kumagai C, Liang S, Schneider R, Singleton D, Wisniewska J, Tartakoff AM. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol* 1994a; 126: 649-659.
- Kadowaki T, Hitomi M, Chen S, Tartakoff AM. Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol Biol Cell* 1994b; 5: 1253-1263.
- Kalnins VI, Stick HF, Bencosme SA. Fine structure of the nucleolar of salivary gland chromosome of chromomids. *J Ultrastruc Res* 1964; 11: 282-291.
- Karasaki S. Electron microscopic examination of the sites of nuclear RNA synthesis during amphibian embryogenesis. *J Cell Biol* 1965; 26: 937-958.
- Karpen GH, Schaefer JE, Laird CD. A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev* 1988; 2: 1745-1763.
- Kass S, Tyc K, Steitz JA, Sollner-Webb B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 1990; 60: 897-908.
- Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Gasser SM, Guarente L. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 1997; 89: 381-391.
- King D, Barnhisel M. Synthesis of RNA in mammalian cells during mitosis and interphase. *J Cell Biol* 1967; 33: 265-272.
- Klein C, Cheutin T, O'Donohue MF, Rothblum L, Kaplan H, Beorchia A, Lucas L, Heliot L, Ploton D. The three-dimensional study of chromosomes and upstream binding factor-immunolabeled nucleolar organizer regions demonstrates their nonrandom spatial arrangement during mitosis. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 3147-3159.
- Knibiehler B, Navarro A, Mirre C, Stahl A. Localization of ribosomal cistrons in the quail oocyte during meiotic prophase I. *Exp Cell Res* 1977; 110: 153-157.

- Knibiehler B, Mirre C, Rosset R. Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus without fibrillar centres: the nucleolus in an established *Drosophila* cell line. *J Cell Sci* 1982; 57: 351-364.
- Knibiehler B, Mirre C, Navarro A, Rosset R. Studies on chromatin organization in a nucleolus without fibrillar centres. Presence of a sub-nucleolar structure in KCo cells of *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 1984; 236: 279-288.
- Ko YG, Kang YS, Kim EK, Park SG, Kim S. Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* 2000; 149: 567-574.
- Kressler D, Linder P, de la Cruz J. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7897-7912.
- Krude T, Elgin SC. Pushing nucleosomes around. *Chromatin. Curr Biol* 1996; 6: 511-515.
- Kuhn A, Voit R, Stefanovsky V, Evers R, Bianchi M, Grummt I. Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity. *EMBO J* 1994; 13: 416-424.
- Lafontaine D, Vandenhaute J, Tollervey D. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev* 1995; 9: 2470-2481.
- Lafontaine D, Tollervey D. One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 3469-3471.
- Lafontaine DL, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D. The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev* 1998; 12: 527-537.
- Lafontaine DL, Tollervey D. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 383-388.
- Lafontaine DL, Tollervey D. Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 1999; 5: 455-467.
- Lafontaine DL, Tollervey D. Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2650-2659.
- Lafontaine JG, Lord A. An ultrastructural and radioautographic investigation of the nucleolonemal component of plant interphase nucleoli. *J Cell Sci* 1973; 12: 369-383.
- Lafontaine JG, Lord A. A correlated light- and electron-microscope investigation of the structural evaluation of the nucleolus during the cell cycle in plant meristematic cells (*Allium cepa*). *J Cell Sci* 1974; 16: 63-93.
- Lange TS, Gerbi SA. Transient nucleolar localization Of U6 small nuclear RNA in *Xenopus Laevis* oocytes. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 2419-2428.
- Lazdins IB, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1997; 105: 481-495.
- Léger-Silvestre I, Gulli MP, Noaillac-Depeyre J, Faubladiet M, Sicard H, Caizergues-Ferrer M, Gas N. Ultrastructural changes in the *Schizosaccharomyces pombe* nucleolus following the disruption of the *gar2+* gene, which encodes a nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma* 1997a; 105: 542-552.

- Léger-Silvestre I, Noaillac-Depeyre J, Faubladié M, Gas N. Structural and functional analysis of the nucleolus of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 1997b; 72: 13-23.
- Léger-Silvestre I, Trumtel S, Noaillac-Depeyre J, Gas N. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 1999; 108: 103-113.
- Lepoint A, Goessens G. Nucleologenesis in Ehrlich tumour cells. *Exp Cell Res* 1978; 117: 89-94.
- Locke M, Huie P. The nucleolus during epidermal development in an insect. *Tissue Cell* 1980; 12: 175-194.
- Long EO, Dawid IB. Alternative pathways in the processing of ribosomal RNA precursor in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 1980; 138: 873-878.
- MacGregor HC. Ways of amphifying ribosomal genes. In : The nucleolus. Jordan EG, Cullis CA, eds; Cambridge University Press : Cambridge 1982; 15: 129-151.
- Mais C, Scheer U. Molecular architecture of the amplified nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 2001; 114: 709-718.
- Maraia RJ. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase III transcripts. *J Cell Biol* 2001; 153: F13-F18.
- Martin M, Moreno Diaz de la Espina S, Medina FJ. Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma* 1989; 98: 368-377.
- Martin M, Medina FJ. A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *J Cell Sci* 1991; 100 (Pt 1): 99-107.
- Martin M, Garcia-Fernandez LF, Diaz de la Espina SM, Noaillac-Depeyre J, Gas N, Javier MF. Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp Cell Res* 1992; 199: 74-84.
- Matera AG, Tycowski KT, Steitz JA, Ward DC. Organization of small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 1289-1299.
- McCully EK, Robinow CF. Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* : a comparative study with light and electron microscopy. *J Cell Sci* 1971; 9: 475-507.
- McKnight SL, Miller OL, Jr. Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1976; 8: 305-319.
- McStay B, Sullivan GJ, Cairns C. The *Xenopus* RNA polymerase I transcription factor, UBF, has a role in transcriptional enhancement distinct from that at the promoter. *EMBO J* 1997; 16: 396-405.
- Medina F, Risueno MC, Sanchez-Pina M, Fernandez-Gomez. A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma* 1983; 88: 149-155.
- Medina FJ, Cerdido A, de Carcer G. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur J Histochem* 2000; 44: 117-131.
- Meier UT, Blobel G. NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol* 1994; 127: 1505-1514.

- Melcak I, Risueno MC, Raska I. Ultrastructural nonisotopic mapping of nucleolar transcription sites in onion protoplasts. *J Struct Biol* 1996; 116: 253-263.
- Melese T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 319-324.
- Mena CG, Testillano PS, Gonzalez-Melendi P, Gorab E, Risueno MC. Immunoelectron microscopy of RNA combined with nucleic acid cytochemistry in plant nucleoli. *Exp Cell Res* 1994; 212: 393-408.
- Miller OL, Jr., Beatty BR. Visualization of nucleolar genes. *Science* 1969; 164: 955-957.
- Mirre C, Stahl A. Ultrastructural study of nucleolar organizers in the quail oocyte during meiotic prophase I. *J Ultrastruct Res* 1976; 56: 186-201.
- Mirre C, Stahl A. Peripheral RNA synthesis of fibrillar center in nucleoli of Japanese quail oocytes and somatic cells. *J Ultrastruct Res* 1978; 64: 377-387.
- Molenaar I, Sillevis-Smitt WW, Rozijn ThH, Tonino GJM. Biochemical and electron microscopic study of isolated yeast nuclei. *Exp Cell Res* 1970; 60: 148-156.
- Morag D, Friedlander M, Raveh D. Synaptonemal complexes, telomeric nucleoli and the karyosphere in achiasmatic oocyte meiosis of the carob moth. *Chromosoma* 1982; 87: 293-302.
- Morcillo G, de la Torre C. Mapping nucleologenesis in relation to transcription. *Biol Cell* 1979; 36: 1-6.
- Moreno F, Rodrigo R, Gracia-Navarro F, Garcia-Herdugo G. Nucleolar component behaviour in plant cells under different physiological conditions. A morphological, cytochemical and quantitative study. *Biol Cell* 1989a; 65: 67-74.
- Moreno F, Rodrigo R, Garcia-Herdugo G. An experimental approach to nucleolar organization in plant cells : a morphological, cytochemical and quantitative study. *J Cell Sci* 1989b; 94: 51-69.
- Moreno F, Rodrigo R, Garcia-Herdugo G. Ag-NOR proteins and rDNA transcriptional activity in plant cells. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1879-1887.
- Mosgöller W, Schofer C, Derenzini M, Steiner M, Maier U, Wachtler F. Distribution of DNA in human Sertoli cell nucleoli. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1487-1493.
- Moss T, Stefanovsky VY. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; 50: 25-66.
- Motte P, Mosen H, Bronchart R, Deltour R. Ultrastructural localization of argyrophilic proteins in nucleoli of *Zea mays* by two silver staining techniques. *Biol Cell* 1988; 64: 97-100.
- Motte P. Etude par cytochimie ultrastructurale de la chromatine associée au nucléole lors de la germination de *Zea mays* L. Thèse de doctorat ; Liège 1991.
- Motte PM, Loppes R, Menager M, Deltour R. Three-dimensional electron microscopy of ribosomal chromatin in two higher plants: a cytochemical, immunocytochemical, and *in situ* hybridization approach. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1495-1506.
- Mougey EB, O'Reilly M, Osheim Y, Miller OL, Jr., Beyer A, Sollner-Webb B. The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* 1993; 7: 1609-1619.

- Moyne G, Bertaux O, Puvion E. The nucleus of *Euglena*. I. An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis* Z. *J Ultrastruct Res* 1975; 52: 362-376.
- Moyne G, Collenot G. Unusual nucleolar fine structure in the Sertoli cells of the dog-fish *Scyliorhinus canicula* (L). *Biol Cell* 1982; 44: 239-248.
- Mukharyamova KS, Doudnik OA, Speransky AI, Zatsepina OV. Double immunolocalization of major nucleolar proteins, fibrillarin and B23, in dividing mammalian cultured cells. *Membr Cell Biol* 1999; 12: 829-843.
- Naus C, Kidder G. Regulation of expression of the ribosomal RNA cistrons in *Ilyanassa* embryos : nucleolus-like bodies and nucleogenesis. *J Exp Zool* 1982; 219: 51-66.
- Oakes M, Nogi Y, Clark MW, Nomura M. Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2441-2455.
- Oakes M, Siddiqi I, Vu L, Aris J, Nomura M. Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 8559-8569.
- Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H. Fibrillarin : a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 1985; 54: 123-134.
- Ochs RL, Reilly MT, Freeman JW, Busch H. Intranucleolar localization of human proliferating cell nucleolar antigen p120. *Cancer Res* 1988; 48: 6523-6529.
- Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* 2000; 108: 501-513.
- Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 1974; 183: 330-332.
- Olins AL, Olins DE, Franke WW. Stereo-electron microscopy of nucleoli, Balbiani rings and endoplasmic reticulum in *Chironomus* salivary gland cells. *Eur J Cell Biol* 1980; 22: 714-723.
- Olins AL, Olins DE, Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Gounon P, Robert-Nicoud M, Jovin TM. Replication bands and nucleoli in the macronucleus of *Euplotes eurystomus*: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol Cell* 1988; 62: 83-93.
- Olmedilla A, Testillano PS, Vicente O, Delseny M, Risueno MC. Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli. RNA/RNA in situ hybridization, autoradiography and cytochemistry. *J Cell Sci* 1993; 106 (Pt 4): 1333-1346.
- Olson MOJ. The role of proteins in nucleolar structure and function. In : The eukaryotic nucleus. Strauss PR, Wilson SH, eds; Telford Press 1990; 2: 519-559.
- Olson MO, Dunder M, Szebeni A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 189-196.
- Osheim YN, Mougey EB, Windle J, Anderson M, O'Reilly M, Miller OL, Jr., Beyer A, Sollner-Webb B. Metazoan rDNA enhancer acts by making more genes transcriptionally active. *J Cell Biol* 1996; 133: 943-954.
- Peculis BA, Steitz JA. Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 1993; 73: 1233-1245.
- Peculis BA. RNA-binding proteins: if it looks like a sn(o)RNA.. *Curr Biol* 2000; 10: R916-R918.

- Pederson T. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 1998a; 26: 3871-3876.
- Pederson T. Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol* 1998b; 143: 279-281.
- Pederson T, Politz JC. The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol* 2000; 148: 1091-1095.
- Pierron G, Pedron J, Schelling M, Christensen M. Immunoelectron microscopic localization of the nucleolar protein B-36 (fibrillarin) during the cell cycle of *Physarum polycephalum*. *Biol Cell* 1989; 65: 119-126.
- Pierron G, Puvion-Dutilleul F. Mitotic segregation of the nucleolar ribosomal RNA in *Physarum polycephalum*. *Exp Cell Res* 1993; 208: 509-517.
- Pierron G, Puvion-Dutilleul F. Localization of the newly initiated and processed ribosomal primary transcripts during the mitotic cycle in *Physarum polycephalum*. *Exp Cell Res* 1996; 229: 407-420.
- Pikaard CS, Pape LK, Henderson SL, Ryan K, Paalman MH, Lopata MA, Reeder RH, Sollner-Webb B. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4816-4825.
- Ploton D, Bendayan M, Adnet JJ. Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins and nucleic acids in reticulated nucleoli. *Biol Cell* 1983; 49: 29-34.
- Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C, Pederson T. Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 55-60.
- Potashkin JA, Derby RJ, Spector DL. Differential distribution of factors involved in pre-mRNA processing in the yeast cell nucleus. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3524-3534.
- Prescott D, Bender M. Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res* 1962; 26: 260-268.
- Putnam CD, Copenhaver GP, Denton ML, Pikaard CS. The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6476-6488.
- Puvion E, Moyné G. *In situ* localization of RNA structures. In : The cell nucleus. Busch H, ed; Academic Press : New York 1981; 8: 59-115.
- Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP. Ribosomal transcriptional complexes in subnuclear fractions of Chinese hamster ovary cells after short-term actinomycin D treatment. *J Ultrastruct Res* 1979; 66: 190-199.
- Puvion-Dutilleul F. Morphology of transcription at cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol* 1983; 84: 57-101.
- Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Puvion E. Nucleolar organization of HeLa cells as studied by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1991a; 100: 395-409.
- Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Christensen ME, Bachellerie JP. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol* 1991b; 56: 178-186.
- Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Pichard E, Bachellerie JP, Puvion E. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur J Cell Biol* 1992; 58: 149-162.

- Puvion-Dutilleul F, Pierron G. Localization by high resolution *in situ* hybridization of the ribosomal minichromosomes during the nucleolar cycle of *Physarum polycephalum*. *Exp Cell Res* 1992; 203: 354-364.
- Puvion-Dutilleul F, Puvion E, Bachellerie JP. Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by *in situ* hybridization with a 5'ETS leader probe. *Chromosoma* 1997; 105: 496-505.
- Raikova EV. Evolution of the nucleolar apparatus during oogenesis in *Acipenseridae*. *J Embryol Exp Morph* 1976; 35: 667-687.
- Raska I, Valouch P, Armbruster BL, Hinterberger M, Maly A, Vorlicek J, Smetana K, Kellenberger E. Ultrastructural localization of rRNA in HeLa cells, rat liver cells and *Xenopus laevis* oocytes by means of the monoclonal antibody-protein A-gold technique. *Histochem J* 1985; 17: 925-938.
- Raska I, Reimer G, Jarnik M, Kostrouch Z, Raska K, Jr. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? *Biol Cell* 1989; 65: 79-82.
- Raska I, Ochs RL, Salamin-Michel L. Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microsc Rev* 1990; 3: 301-353.
- Raska I, Dundr M, Koberna K. Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biol Int Rep* 1992; 16: 771-789.
- Raska I, Dundr M. Compartmentalization of the cell nucleus : case of the nucleolus. In : *Chromosomes Today*. Sumner AT, Chandley AC, eds; Chapman et Hall : London 1993; 11: 101-119.
- Raska I, Dundr M, Koberna K, Melcak I, Risueno MC, Torok I. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J Struct Biol* 1995; 114: 1-22.
- Recher L, Whitescarver J, Briggs L. The fine structure of a nucleolar constituent. *J Ultrastruct Res* 1969; 29: 1-14.
- Reeder RH, Higashinakagawa T, Miller O, Jr. The 5' leads to 3' polarity of the *Xenopus* Ribosomal RNA precursor molecule. *Cell* 1976; 8: 449-454.
- Reeder RH. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999; 62: 293-327.
- Reeves R. Transcriptionally active chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1984; 782: 343-393..
- Reimer G, Raska I, Tan EM, Scheer U. Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1987a; 54: 131-143.
- Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest* 1987b; 79: 65-72.
- Rendon MC, Rodrigo RM, Goenechea LG, Garcia-Herdugo G, Valdivia MM, Moreno FJ. Characterization and immunolocalization of a nucleolar antigen with anti-NOR serum in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1992; 200: 393-403.
- Ripmaster TL, Vaughn GP, Woolford JL, Jr. DRS1 to DRS7, novel genes required for ribosome assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7901-7912.

- Risueno MC, Medina FJ, Moreno Diaz de la Espina. Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J Cell Sci* 1982; 58: 313-329.
- Risueno MC, Medina FJ. The nucleolar structure in plant cells. *Revis Biol Celular* 1986; 7: 1-154.
- Risueno MC, Testillano PS. Cytochemistry and immunocytochemistry of nucleolar chromatin in plants. *Micron* 1994; 25: 331-360.
- Ro-Choi TS. Nucleolar snoRNA and ribosome production. *Mol Cells* 1997; 7: 451-467.
- Rodrigo RM, Rendon MC, Torreblanca J, Garcia-Herdugo G, Moreno FJ. Characterization and immunolocalization of RNA polymerase I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells. *J Cell Sci* 1992; 103 (Pt 4): 1053-1063.
- Rodriguez-Sanchez J, Gelpi C, Juarez C, Hardin J. Anti-NOR90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J Immunology* 1987; 139: 2579-2584.
- 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 (Pt 2): 327-337.
- 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.
- Rudt F, Pieler T. Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J* 1996; 15: 1383-1391.
- Rué G, Bierne J. An ultrastructural and cytochemical study of the nucleolus-DNA body complex of *Amphiporus lactiflorus* oocytes. *Biol Cell* 1983; 49: 203-212.
- Sato S. Ultrastructural localization of nucleolar material by a simple silver staining technique devised for plant cells. *J Cell Sci* 1985; 79: 259-269.
- Sato S. Estimation of RNA content of the nucleolus and nucleolus-derived structures in *Vicia faba* mitotic cells embedded in Lowicryl resin using RNase-gold labeling. *J Electron Microsc* 1990; 39: 382-387.
- Sato S. Three-dimensional architecture of the higher plant nucleonema disclosed on serial ultrathin sections. *Biol Cell* 1992; 75: 225-233.
- Savino R, Gerbi SA. In vivo disruption of *Xenopus* U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1990; 9: 2299-2308.
- 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 (Pt 12): 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.
- Scheer U, Kleinschmidt JA, Franke WW. Transcriptional and skeletal elements in nucleoli of amphibian oocytes. In : *The nucleolus*. . Jordan EG, Cullis CA, eds; Cambridge University Press : Cambridge 1982; 15: 25-42.

- Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 1431-1435.
- Scheer U, Messner K, Hazan R, Raska I, Hansmann P, Falk H, Spiess E, Franke WW. High sensitivity immunolocalization of double and single-stranded DNA by a monoclonal antibody. *Eur J Cell Biol* 1987; 43: 358-371.
- Scheer U, Raska I. Immunocytochemical localization of RNA polymerase I in the fibrillar centers of nucleoli. In : *Chromosomes Today*. Stahl A, Luciani J, Vagner-Capodano A, eds; Allen and Unwin : London 1987; 9: 284-294.
- Scheer U, Benavente R. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* 1990; 12: 14-21.
- Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma* 1997; 105: 470-480.
- Scheer U, Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 385-390.
- Schimmang T, Tollervey D, Kern H, Frank R, Hurt EC. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J* 1989; 8: 4015-4024.
- Schmitt M, Clayton D. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7935-7941.
- Schnapp G, Santori F, Carles C, Riva M, Grummt I. The HMG box-containing nucleolar transcription factor UBF interacts with a specific subunit of RNA polymerase I. *EMBO J* 1994; 13: 190-199.
- Schneiter R, Kadowaki T, Tartakoff AM. mRNA transport in yeast: time to reinvestigate the functions of the nucleolus. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 357-370.
- Schwarzacher HG, Wachtler F. Nucleolus organizer regions and nucleoli: cytological findings. In : *Chromosomes Today*. Stahl A, Luciani J, Vagner-Capodano A, eds; Allen and Unwin : London 1987; 9: 252-260.
- Schwarzacher HG, Wachtler F. The functional significance of nucleolar structures. *Ann Genet* 1991; 34: 151-160.
- Selzer PL, Webster P, Duszenko M. Influence of Ca²⁺ depletion on cytoskeleton and nucleolus morphology in *Trypanosoma Brucei*. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 104-112.
- Shaw PJ, Jordan EG. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 93-121.
- Shaw PJ, Hightett MI, Beven AF, Jordan EG. The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J* 1995; 14: 2896-2906.
- Shykind BM, Kim J, Stewart L, Champoux JJ, Sharp PA. Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev* 1997; 11: 397-407.
- Siev M, Weinberg R, Penman S. The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin. *J Cell Biol* 1969; 41: 510-520.
- Sillevis-Smitt WW, Vlak JM, Molenaar I, Rozijn H. Nucleolar function of the dense crescent in the yeast nucleus. *Exp Cell Res* 1973; 80: 313-321.

- Simard R, Langelier Y, Mandeville R, Maestracci N, Royal A. Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus. In : The cell nucleus. Bush H, ed; Academic Press : New York 1974; 3: 447-487.
- Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles : a cause of aging in yeast. *Cell* 1997; 91: 1033-1042.
- Sinclair DA, Mills K, Guarente L. Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 131-134.
- 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 (Pt 19): 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.
- Smith CM, Steitz JA. Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. *Cell* 1997; 89: 669-672.
- Smith HC, Rothblum LJ. Ribosomal DNA sequences attached to the nuclear matrix. *Biochem Genet* 1987; 25: 863-879.
- Smith SD, Oriahi E, Yang YH, Xie WQ, Chen C, Rothblum LI. Interaction of RNA polymerase I transcription factors with a promoter in nontranscribed spacer of rat ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1677-1685.
- Soyer-Gobillard MO, Geraud ML, Coulaud D, Barry M, Theveny B, Revet B, Delain E. Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote Dinoflagellate. *J Cell Biol* 1990; 111: 293-304.
- Soyez-Gobillard MO, Géraud ML. Nucleolus behaviour during the cell cycle of a primitive dinoflagellate eukaryote, *Prorocentrum micans* Ehr, seen by light microscopy and electron microscopy. *J Cell Sci* 1992; 102: 475-485.
- Stahl A, Wachtler F, Hartung M, Devictor M, Schofer C, Mosgöller W, de Lanversin A, Fouet C, Schwarzacher HG. Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal genes in the human spermatocyte. *Chromosoma* 1991; 101: 231-244.
- Standiford DM. The development of a large nucleolus during oogenesis in *Acanthocyclops vernalis* (Crustacea, Copepoda) and its possible relationship to chromatin diminution. *Biol Cell* 1988; 63: 35-40.
- Steitz JA, Berg C, Hendrick JP, Branche-Chabot H, Metspalu A, Rinke J, Yario T. A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* 1988; 106: 545-556.
- Stephanova E, Stancheva R, Avramova Z. Binding of sequences from the 5'- and 3'- nontranscribed spacers of the rat rDNA locus to the nucleolar matrix. *Chromosoma* 1993; 102: 287-295.
- Stevens AR, de Jonckheere J, Willaert E. *Naegleria lavaniensis* new species : isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fawleri*. *Int J Parasitol* 1980; 10: 51-64.
- Stevens BJ. The effect of actinomycin D on nucleolar and nuclear fine structure in the salivary gland cell of *Chironomus thummi*. *J Ultrastr Res* 1964; 11: 329-353.

- Stevens BJ. The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell. *J Cell Biol* 1965; 24: 349-368.
- Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* 1998; 279: 1534-1541.
- Suhadolnik RJ. Naturally occurring nucleoside and nucleotide antibiotics. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1979; 22: 193-291.
- Sun C, Woolford JL Jr. The yeast NOP4 gene production essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *EMBO J* 1994; 13: 3127-3135.
- Tani T, Derby RJ, Hiraoka Y, Spector DL. Nucleolar accumulation of poly (A)⁺ RNA in heat-shocked yeast cells: implication of nucleolar involvement in mRNA transport. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 1515-1534.
- Taylor J. Nucleic acid synthesis in relation to the cell cycle. *Ann NY Acad Sci* 1960; 90: 409-421.
- Testillano PS, Gorab E, Risueno MC. A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1-10.
- Testillano PS, Gonzalez-Melendi P, Ahmadian P, Fadon B, Risueno MC. The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp Cell Res* 1995; 221: 41-54.
- Theissen A, Compère Ph, Goessens G, Goffinet G. Etude ultrastructurale du nucléole des cellules de l'épiderme associé à la cuticule minéralisée du crabe vert, *Carcinus maenas*, au cours du cycle de mue. *Bull Soc Roy Liège* 1988; 1: 3-11.
- Thomas J. The higher order structure of chromatin and histone H1. *J Cell Sci* 1984; suppl 1: 1-20.
- Thompson WF, Beven AF, Wells B, Shaw PJ. Sites of rDNA transcription are widely dispersed through the nucleolus in *Pisum sativum* and can comprise single genes. *Plant J* 1997; 12: 571-581.
- Tolerico LH, Benko AL, Aris JP, Stanford DR, Martin NC, Hopper AK. *Saccharomyces cerevisiae* Mod5p-II contains sequences antagonistic for nuclear and cytosolic locations. *Genetics* 1999; 151: 57-75.
- Tollervey D, Lehtonen H, Carmo-Fonseca M, Hurt EC. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J* 1991; 10: 573-583.
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 1993; 72: 443-457.
- Tremblay C, Gugg S, Lafontaine J. Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical investigation of the interphase nucleus in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol Cell* 1992; 76: 73-86.
- Trimbur GM, Walsh CJ. Nucleolus-like morphology produced during the in vitro reassociation of nucleolar components. *J Cell Biol* 1993; 122: 753-766.
- Tröster H, Spring H, Meissner B, Schultz P, Oudet P, Trendelenburg MF. Structural organization of an active, chromosomal nucleolar organizer region (NOR) identified by

- light microscopy, and subsequent TEM and STEM electron microscopy. *Chromosoma* 1985; 91: 151-163.
- Trumtel S, Léger-Silvestre I, Gleizes PE, Teulieres F, Gas N. Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 2175-2189.
- Tuan JC, Zhai W, Comai L. Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2872-2879.
- Tyc K, Steitz JA. U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J* 1989; 8: 3113-3119.
- van Gansen P, Schram A. Evolution of the nucleoli during oogenesis in *Xenopus laevis* studied by electron microscopy. *J Cell Sci* 1972; 10: 339-367.
- van Holde KE. *Chromatin*. Springer Verlag : New York 1988; 289-343.
- Venema J, Tollervey D. Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1995; 11: 1629-1650.
- Venema J, Tollervey D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 261-311.
- Verheggen C, Almouzni G, Hernandez-Verdun D. The ribosomal RNA processing machinery is recruited to the nucleolar domain before RNA polymerase I during *Xenopus laevis* development. *J Cell Biol* 2000; 149: 293-306.
- Visintin R, Amon A. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 752.
- Voit R, Schnapp A, Kuhn A, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG, Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 1992; 11: 2211-2218.
- von Gaudecker B. RNA synthesis in the nucleolus of *Chironomus thummi*, as studied by high resolution autoradiography. *Zeitschrift Zellforschung* 1967; 82: 536-557.
- Wachtler F, Mosgöller W, Schwarzacher HG. Electron microscopic *in situ* hybridization and autoradiography: localization and transcription of rDNA in human lymphocyte nucleoli. *Exp Cell Res* 1990; 187: 346-348.
- Wachtler F, Schöfer C, Mosgöller W, Weipoltshammer K, Schwarzacher HG, Guichaoua M, Hartung M, Stahl A, Berge-Lefranc JL, Gonzalez I, . Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli: light and electron microscopic *in situ* hybridization in human Sertoli cells. *Exp Cell Res* 1992; 198: 135-143.
- Wachtler F, Stahl A. The nucleolus : a structural and functional interpretation. *Micron* 1993; 24: 473-505.
- Wansink DG, Schul W, van dK, I, van Steensel B, van Driel R, de Jong L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol* 1993; 122: 283-293.
- Warner JR. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1989; 53: 256-271.

- Warner JR. The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2: 521-527.
- Weinstein LB, Steitz JA. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 378-384.
- Weintraub H, Groudine M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 1976; 193: 848-856.
- Weisenberger D, Scheer U. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol* 1995; 129: 561-575.
- Yoo CJ, Wolin SL. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5412-5424.
- 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.

Abréviations, sigles et acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
C23, B23 : protéines nucléolaires (chez les Mammifères)
Cbf5p : protéine nucléolaire chez la Levure, analogue de la NAP57 chez les Mammifères
DNase I : désoxyribonucléase I
Eco R1, Sal 1 : sites de clivage d'endonucléases de restriction de l'ADN
G1, S et G2 : phases du cycle cellulaire
H1, H2A, H2B, H3, H4 : histones
kb : kilobase
kD : kilodalton
MRP : "mitochondrial RNA processing", RNase intervenant dans un des clivages de l'ARN primaire
NAP57 : protéine associée à la Nopp140 de 57 kD
Nop1 : protéine nucléolaire chez la Levure, analogue à la fibrillarine chez les Mammifères
Nop 56 et Nop 58 : protéines nucléolaires de 56 et 58 kD (chez la Levure)
Nopp140 : phosphoprotéine nucléolaire de 140 kD (chez les Mammifères)
NOR : "nucleolar organizer region", région de l'organisateur nucléolaire
pb : paire de bases
pBR322 : plasmide
PNB : "prenucleolar body", corps prénucléolaires
poly r(A-U) : polyribonucléotide formé des bases adénosine et uridine
pp135 : phosphoprotéine de 135 kD (chez les Mammifères)
RAP67 : protéine de 67 kD associée à l'ARN polymérase I (chez les Mammifères)
Rnase : ribonucléase
S : unité Svedberg
snARN : "small nuclear ARN", petit ARN nucléaire
snoARN : "small nucleolar ARN", petit ARN nucléolaire
TIF-IA, TIF-IB, TIF-IC : facteurs de mise en route de la transcription
U3, U8, U6 : petits ARN nucléolaires riches en uridine
UBF : "upstream binding factor"
UTP : uridine triphosphate

Tableau I : Liste des lignées cellulaires ou tissulaires sur lesquelles la méthode immunocytologique de l'allongement des extrémités libres de l'ADN par une transférase spécifique a été appliquée

	Références
Homme	
Cellules HeLa	Thiry and Goessens, 1992a ; Thiry et al., 1993 ; Thiry, 1995a.
Cellules HEp-2	Thiry et al., 1993 ; Scheer et al., 1993.
Cellules MRC5	Thiry, 1992b.
Cellules RT4	Thiry et al., 1997.
Cellules DU 145	Résultats non publiés.
Cellules K562	Thiry et al., 1993.
Lymphocytes T	Vandelaer et al., 1993 ; Thiry, 1995b.
Cellules de Sertoli	Thiry, 1993b.
Spermatocytes	Résultats non publiés.
Singe	
Cellules Vero	Thiry, 1992b.
Cellules Cos	Thiry, 1992b.
Souris	
Cellules tumorales d'Ehrlich	Thiry, 1992a, 1992b, 1992c ; Scheer et al., 1993 ; Thiry et al., 1993.
Cellules L 929	Gilles et al., 1995.
Cellules L 1210	Thiry et al., 1993.
Lymphocytes spléniques	Thiry et al., 1993.
Rat	
Hépatocytes	Mikhaylova et al., 1996.
Cellules épithéliales du jéjunum	Résultats non publiés.
Cellules endothéliales	Résultats non publiés.
Cellules embryonnaires du cortex cérébelleux	Résultats non publiés.
Cellules musculaires lisses de la lamina propria de l'intestin grêle	Résultats non publiés.
Ovocytes	Thiry and Goessens, 1992b.
Hamster	
Cellules CHO	Thiry et al., 1993.
Poulet	
Fibroblastes	Thiry, 1992b ; Thiry et al., 1993.
Porc	
Cellules PK	Zatsepina et al., 1997a.

Tableau II : Liste non exhaustive des espèces dans lesquelles des centres fibrillaires n'ont pas été observés.

Espèces	Références
Protistes	
<i>Prorocentrum micans</i>	Soyer-Gobillard et al., 1992.
<i>Euglena gracilis</i>	Bertaux et al., 1978 ; Moyne et al., 1975.
<i>Astresia longa</i>	Chaly et al., 1979.
<i>Amoeba proteus</i>	Flickinger, 1968.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Dehan and Goessens, 1988.
<i>Nagleria</i> (diverses espèces)	Carosi et al., 1976, 1986 ; Stevens et al., 1980 ; Trimbur and Walsh, 1993.
<i>Histiculus similis</i>	Rodrigo et al., 1992.
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Caratero et al., 1984.
<i>Euplotes</i> (diverses espèces)	Greco et al., 1987 ; Olins et al., 1988.
<i>Trypanosoma brucei</i>	Selzer et al., 1991 ; Ogbadoyi et al., 2000.
<i>Physarum polycephalum</i>	Pierron et al., 1989.
Mycophytes	
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Sillevis-Smitt et al., 1973.
Némertiens	
<i>Amphiporus lactiflorus</i>	Rué and Bierne, 1983.
Annélides	
<i>Nereis diverticolor</i>	Bertout, 1984.
Mollusques	
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	Naus and Kidder, 1982.
<i>Helcion pellucidus</i>	Azevedo et al., 1984.
Arthropodes	
Crustacés	
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Standiford, 1988.
<i>Carcinus maenas</i>	Theissen et al., 1988.
Insectes	
<i>Gryllus</i> (diverses espèces)	Favard-Soreno, 1968.
<i>Acheta domesticus</i>	Tröster et al., 1985.
<i>Blattella germanica</i>	Cave, 1976.
<i>Chortophaga viridifasciata</i>	Stevens, 1965.
<i>Chironomus</i> (diverses espèces)	Kalnins et al., 1964 ; Olins et al., 1980 ; Stevens, 1964.
<i>Smittia parthenogenetica</i>	Jacob, 1967.
<i>Drosophila melanogaster</i>	Knibiehler et al., 1984.
<i>Calpodes ethlius</i>	Locke and Huie, 1980.
<i>Ectomylois ceratoniae</i>	Morag et al., 1982.
Chordés	
Poissons	
Chondrichthyens	
<i>Scyliorhinus canacula</i>	Moyne and Collenot, 1982.
<i>Squalus acanthias</i>	Moyne and Collenot, 1982.
<i>Raia radiata</i>	Moyne and Collenot, 1982.
Ostéichthyens	
<i>Acipenser</i> (diverses espèces)	Raikova, 1976.
<i>Xiphophorus helleri</i>	Azevedo and Coimbra, 1980.

Amphibiens**Urodèles***Pleurodeles* (diverses espèces)

Angelier and Lacroix, 1975 ; Scheer et al, 1982.

Anoures*Xenopus laevis*

Boloukhere, 1984 ; Raska et al., 1985 ; Scheer et al., 1982 ; van Gansen and Schram, 1972.

Tableau III : Comparaison de la distribution des éléments constitutifs au sein des divers compartiments nucléolaires dans les nucléoles bi- et tricompartmentés.

	Nucléoles bicompartmentés	Nucléoles tricompartmentés
ADN	CF	F
ADN ribosomique	CF	F
ARN polymérase I	CF	F
UBF	CF + CFD	F
Protéines AgNOR	CF + CFD	F
Phosphoprotéine pp135	CF + CFD	F
Fibrillarine	CFD	F
ARN	CF + CFD + CG	F + G
ARN ribosomique	CF + CFD + CG	F + G

CF : centre fibrillaire ; CFD : constituant fibrillaire dense ; CG : constituant granulaire ;
 F : zone fibrillaire ; G : zone granulaire.