



HAL
open science

Rôle de l'interférence à l'ARN et de Mmi1 dans la régulation de la différenciation sexuelle chez le Schizosaccharomyces pombe

Aurelia Vavasseur

► **To cite this version:**

Aurelia Vavasseur. Rôle de l'interférence à l'ARN et de Mmi1 dans la régulation de la différenciation sexuelle chez le Schizosaccharomyces pombe. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV041 . tel-00676306

HAL Id: tel-00676306

<https://theses.hal.science/tel-00676306>

Submitted on 5 Mar 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aurélia VAVASSEUR

Thèse dirigée par **André VERDEL** et

Co-dirigée par **Saadi KHOCHBIN**

préparée au sein de l'Institut Albert Bonniot
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Rôle de l'interférence à l'ARN et de Mmi1 dans la régulation de la différenciation sexuelle chez *Schizosaccharomyces pombe*

Thèse soutenue publiquement le **27 septembre 2011**,
devant le jury composé de :

Mr Robert FEIL

Directeur de recherche, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier,
Président

Mr Jean-Paul JAVERZAT

Directeur de recherche, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires,
Bordeaux, Rapporteur

Mr Michael PRIMIG

Directeur de recherche, Université de Rennes 1, Rapporteur

Mr Ramesh PILLAI

Directeur de recherche, European Molecular Biology Laboratory,
Grenoble, Examineur

Mr Saadi KHOCHBIN

Directeur de recherche, Institut Albert Bonniot, Grenoble, Membre

Mr André VERDEL

Chargé de recherche, Institut Albert Bonniot, Grenoble, Membre



-Remerciements-

Je remercie André Verdel pour son encadrement, pour m'avoir formée, avoir partagé avec moi tout son savoir-faire et sa vision de la recherche, et pour sa patience.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe passés et en cours, en particulier Sophie Barral, qui a initié ce projet de recherche, Leila Todeschini, Benoit Gilquin, Emeline Lambert, Edwige Hiriart, Daniel Perazza, Cyril Boyault et Jonathan Pérot. Je les remercie pour leur contribution à ce projet de recherche, pour leurs conseils et leur soutien, pour toutes ces discussions enrichissantes.

Merci à nos collaborateurs de la plateforme ProfileXpert de Lyon pour l'étude transcriptomique.

Merci à Saadi Khochbin, Stefan Dimitrov, Claire Vourc'h et Stefan Nonchev ainsi qu'à l'ensemble de l'institut, pour tout le soutien apporté à notre équipe. Merci en particulier à Véronique Gerson, Fabienne Hans, Catherine Souchier pour leurs conseils avisés, et à Aude Marchand, Dalenda Benmedjahed, et Béatrice Inthavong pour m'avoir écoutée et aidée tout au long de ces années.

Je remercie Robert Feil, Jean-Paul Javerzat, Ramesh Pillai et Michael Primig d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de doctorat.

Merci à tous les étudiants (et autres ;-) pour avoir su mettre cette bonne ambiance dans l'institut, pour nos soirées, nos sorties en montagne...

Merci à ma famille et mes amis, pour leur écoute, leur réconfort, leur conseil et tous ces bons moments.

-Sommaire-

-Abréviations-	7
-Introduction-	9
Chapitre I Chromatine et régulations épigénétiques	11
1.1. Structure et fonction de la chromatine	11
1.1.1. Organisation structurale de la chromatine	12
1.1.2. Organisation spatio-fonctionnelle de la chromatine : euchromatine et hétérochromatine	14
1.1.3. Epigénétique et mécanismes impliqués dans la dynamique de la chromatine.....	15
1.1.3.1. Mécanismes d'assemblage et de remodelage du nucléosome	16
1.1.3.2. Modifications post-traductionnelles des histones et protéines associées	18
1.1.3.3. Méthylation de l'ADN.....	20
1.2. L'hétérochromatine	23
1.2.1. L'hétérochromatine constitutive	24
1.2.1.1. La chromatine centromérique et l'hétérochromatine péricentromérique.....	24
1.2.1.2. La chromatine télomérique et l'hétérochromatine subtélomérique.....	28
1.2.1.3. L'hétérochromatine de la région du déterminisme sexuel chez <i>S. pombe</i>	29
1.2.2. L'hétérochromatine facultative.....	31
1.2.3. Mécanisme général de formation de l'hétérochromatine	31
1.2.3.1. Formation d'hétérochromatine chez les eucaryotes supérieurs	31
1.2.3.2. Formation d'hétérochromatine chez <i>S. pombe</i>	33
Chapitre II L'interférence à l'ARN	37
2.1. Le RNAi : généralités	37
2.2. Mécanisme général	38
2.2.1. La phase activatrice	39
2.2.1.1. Biogénèse de petits ARN interférants par des ribonucléases	39
2.2.1.2. Génération de petits ARN interférants indépendants des RNases III	43
2.2.2. La phase effectrice dans le cytoplasme.....	45
2.2.2.1. Mécanismes effecteurs dans le cytoplasme par les protéines Argonautes	45
2.2.2.2. Mécanisme d'action des protéines PIWI et des piARN	49
2.3. RNAi et modifications épigénétiques de régions non codantes	50

2.3.1. RNAi nucléaire dans un contexte de différenciation cellulaire ou de développement.....	51
2.3.2. RNAi nucléaire dans les cellules somatiques différenciées et formation d'hétérochromatine	52
2.4. Formation d'hétérochromatine dépendante du RNAi chez <i>S. pombe</i>.....	54
2.4.1. RITS et le ciblage de la chromatine péricentromérique	54
2.4.2. Boucle d'amplification des siARN	57
2.4.3. Mécanismes du « silencing » médié par le RNAi	58
2.4.3.1. « Silencing » transcriptionnel.....	58
2.4.3.2. « Silencing » co-transcriptionnel.....	59
2.4.3.3. « Silencing » post-transcriptionnel.....	60
2.4.4. Les autres régions d'hétérochromatine constitutive	62
2.5. Implication du RNAi nucléaire dans le contrôle de gènes codants ?.....	62
Chapitre III La différenciation sexuelle.....	69
3.1. La différenciation sexuelle, un processus fondamental de la reproduction	69
3.2. Mécanismes d'inhibition de la différenciation sexuelle lors du cycle végétatif ..	71
3.2.1. Inhibition transcriptionnelle du facteur de transcription Ste11	71
3.2.2. Inhibition post-traductionnelle du régulateur Mei2	73
3.2.3. Inhibition post-transcriptionnelle de gènes méiotiques par la protéine Mmi1	74
3.2.3.1. Identification des gènes cibles de Mmi1.....	74
3.2.3.2. Mécanisme de régulation post-transcriptionnelle par Mmi1	76
3.3. Déclenchement de la différenciation sexuelle chez <i>S. pombe</i>	79
3.3.1. Activation du programme transcriptionnel initiateur	79
3.3.2. Neutralisation des inhibiteurs Pat1 et Mmi1	80
3.3.3. Activation du programme transcriptionnel de la méiose et la sporulation	81
3.3.4. Protéines de liaison à l'ARN, ARNnc, et dégradation sélective d'ARNm dans la différenciation sexuelle chez les eucaryotes supérieurs	81
3.4. RNAi et différenciation sexuelle ?.....	82
-Problématique et objectifs-.....	87
-Matériels et méthodes-.....	89
1. Matériel biologique et conditions de culture	89
1.1. Souches utilisées	89
1.2. Conditions de culture des levures	91
1.2.1. Milieux riches	92

1.2.2. Milieux minimum	92
1.3. Description des plasmides utilisés.....	93
1.3.1. Protocole de clonage bactérien	93
1.3.2. Mutagénèse dirigée	93
1.3.3. Liste des plasmides et des amorces nucléotidiques.....	94
2. Construction de souches par transformation et recombinaison homologue	96
2.1. Stratégie d'introduction d'une séquence d'ADN	97
2.2. Amplification par PCR.....	98
2.3. Purification des fragments PCR	99
2.4. Transformation de <i>S. pombe</i>	99
2.5. Sélection des transformants positifs	100
3. Western blot	100
4. Extraction d'ARN totaux	102
5. RT-PCR (Reverse –Transcription PCR)	103
5.1. Digestion de l'ADN par traitement à la DNase I	103
5.2. Synthèse d'ADN complémentaire par transcription inverse et PCR	103
5.3. Analyse des RT par PCR	104
5.4. Test d'épissage des ARN	105
6. Analyse transcriptomique.....	105
6.1. Préparation des échantillons	105
6.2. Marquage des ARN, hybridation et détection des signaux	106
6.3. Annotation des sondes	106
6.4. Normalisation des données	107
6.5. Analyse différentielle de l'expression des régions annotées.....	107
6.6. Analyse par segmentation des régions non-annotées	107
7. Test de « silencing »	108
8. Test de sporulation.....	109
9. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	109
9.1. Principe	109
9.2. Préparation des lysats cellulaires	110
9.3. Immunoprécipitation	111
9.4. Purification de l'ADN immunoprécipité.....	112
9.5. Analyse par PCR radioactive de l'ADN immunoprécipité	112

9.6. Quantification des enrichissements	113
10. Immunoprécipitation de l'ARN (RIP).....	114
10.1. Principe.....	114
10.2. Préparation des lysats cellulaires	114
10.3. Digestion de l'ADN	114
10.4. Immunoprécipitation.....	115
10.5. Purification de l'ARN immunoprécipité	116
10.6. Analyse de l'ARN immunoprécipité par RT-qPCR	116
-Résultats-.....	117
Chapitre I Etude du rôle joué par le RNAi dans la régulation des gènes ciblés par Mmi1 et identification de nouveaux gènes cibles.....	117
1.1. Introduction	117
1.2. Résumé détaillé de l'article de recherche	118
1.3. Article de recherche	120
1.4. Contribution de mon travail de thèse aux travaux de l'article.....	137
1.5. Résultats complémentaires à l'article de recherche	138
1.5.1. Caractérisation du rôle du promoteur du gène <i>mei4</i> dans le recrutement de RITS	138
1.5.1.1. La transcription du gène <i>mei4</i> est nécessaire au recrutement de RITS à la chromatine.....	138
1.5.1.2. La surexpression du gène <i>mei4</i> perturbe le recrutement de Chp1	142
1.5.2. Identification de gènes codants ciblés par le RNAi	146
Chapitre II Caractérisation du rôle de Mmi1 dans le recrutement de Chp1.....	151
2.1. <i>Mmi1 est-elle suffisante pour recruter RITS à un ARN ?</i>	152
2.1.1. Mise en place d'un système rapporteur permettant de cibler Mmi1 à un ARN ..	152
2.1.2. Interaction entre le système rapporteur λ N-Mmi1 / <i>ura4-5BoxB</i> et le RNAi.....	154
2.1.3. Mise en place d'un nouveau système rapporteur Mmi1- λ N / <i>ura4-5BoxB</i>	157
2.2. <i>La séquence DSR du gène <i>mei4</i> est suffisante pour recruter RITS à un ARN produit par le locus de ce gène</i>	159
2.2.1. Mise en place et étude du système rapporteur « <i>ura4-dsr_{mei4}</i> ».....	159
2.2.2. Etude du système rapporteur « <i>ura4*-dsr_{mei4}</i> ».....	165

<i>2.3. La séquence DSR du gène mei4 suffit pour induire le recrutement de Chp1 à un ARN produit par le locus ura4.....</i>	<i>166</i>
-Conclusion-.....	171
-Discussion et perspectives-.....	173
1. Ciblage du gène mei4 par le complexe RITS.....	173
2. Identification des gènes cibles de Chp1	181
3. Rôle du RNAi et de Clr4 dans la régulation de ces gènes méiotiques	185
-Références bibliographiques-.....	189
-Annexes-.....	207
-Abstract-	
-Résumé-	

-Abréviations-

ADN Acide désoxyribonucléique
ADNc ADN complémentaire
ADNg ADN génomique
ago1 argonaute gene 1
ARN Acide ribonucléique
ARNdb ARN double brin
ARNm Acide ribonucléique messenger
ARNnc ARN non codant
ARNsb ARN simple brin
BET Bromure d'éthidium
CDS Séquence codante (Coding Sequence)
ChIP Immunoprécipitation de chromatine (Chromatin Immunoprecipitation)
chp1 / 2 chromodomain gene in *Schizosaccharomyces pombe* 1 / 2
clr4 cryptic loci regulator gene 4
C-ter C-terminal
dcr1 dicer gene 1
dCTP désoxycytosine triphosphate
DNAse Désoxyribonucléase
dNTP mélange équimolaire des 4 désoxy-ribonucléotides constituant l'ADN : désoxyadénine, désoxycytosine, désoxyguanine & désoxythymine triphosphate
DO_x Densité Optique à x nm
DTT Dithiothréitol
Emm Edinburgh minimum medium
EDTA Ethylène diamine tetra-acétique
ET/WCE Extrait total/ Whole Cell Extract
g gramme ou force gravitationnelle selon le sujet discuté
h heure
H3k9me Méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9
hph hygromycine B
IgG Immunoglobuline G
IP Immunoprécipitation
kan généticine G418
Kb Kilobase
kD Kilo Dalton
L litre
M molaire (mol/L)
mei4 meiosis inducing gene 4
miARN microARN
min minute
ml mili litre (10⁻³ L)

mM mili molaire (10^{-3} M)
mmi1 meiotic mRNA interception gene 1
nat nutréomycine
N-ter N-terminal
nt(s) nucléotide(s)
ORF Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
pb paire de bases
PCR Réaction de polymérisation en chaîne
PEG Polyéthylène Glycol
pH potentiel hydrogène
piARN petit ARN associé à Piwi (Piwi-associated RNA)
Piwi P-element induced wimpy testis
PMG Pombe Medium Glutamate
PMSF Phénylméthylsulfonylfluoride
P³² Phosphore 32, isotope radioactif
qPCR Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RdDM Méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN (RNA-dependant DNA methylation)
RdRP RNA-dependant RNA Polymerase
RIP Immunoprécipitation de l'ARN (RNA Immunoprecipitation)
RISC RNA-Induced Silencing Complex
RITS RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing
RNAi Interférence à l'ARN (RNA interference)
RNAse Ribonucléase
rpm rotation par minute
RT Transcription inverse
SDS Dodécylsulfate de sodium
sec seconde
siARN petit ARN interférant (small interfering RNA)
ssm4 suppressor of *sme2* gene 4
ste11 sterility gene 11
swi6 switching gene 6
TAP Purification par affinité en tandem
tas3 targeting complex subunit 3 gene
Tris Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
v volume
YEA Extrait de levure supplémenté en Adénine
YES Extrait de levure supplémenté
µl micro litre (10^{-6} litre)
µm micro mètre (10^{-6} mètre)
µM micro molaire (10^{-6} M)
3' UTR / 5'UTR 3' Untranslated Region / 5' Untranslated Region
5FoA Acide 5-fluorootique
°C degré Celsius

-Introduction-

Chez les eucaryotes, la différenciation sexuelle ou gamétogénèse est un processus conduisant à la formation des gamètes essentiels à la reproduction. La mise en place de l'ensemble de ce processus implique une reprogrammation considérable du schéma de l'expression des gènes. De plus en plus de travaux révèlent un rôle important de l'interférence à l'ARN (RNAi) dans la régulation post-transcriptionnelle de la différenciation sexuelle. Le RNAi est un mécanisme cellulaire conservé au cours de l'évolution des eucaryotes ayant pour fonction principale d'inhiber l'expression de gènes au moyen de petits ARN non codants. Chez certains eucaryotes, comme la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), le RNAi est impliqué dans la formation de l'hétérochromatine, une structure compacte permettant de diminuer globalement l'accessibilité de l'ADN et de réprimer l'expression de séquences non codantes. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de la gamétogénèse par le RNAi restent à détailler.

S. pombe, notre modèle d'étude, est un organisme de référence pour l'étude des mécanismes contrôlant le cycle et la différenciation cellulaire (Forsburg and Nurse, 1991). La reprogrammation transcriptionnelle essentielle à la différenciation sexuelle a été bien étudiée, et implique essentiellement les facteurs de transcription Ste11 (Sterility protein 11 ; Mata and Bahler, 2006) et Mei4 (Meiosis inducing protein 4 ; Mata et al., 2007). Quelques travaux mettent en évidence le rôle émergent de mécanismes de régulation au niveau post-transcriptionnel, pour lesquels la protéine Mmi1 (Meiotic mRNA interception protein 1) est un acteur majeur (Harigaya et al., 2006). Certaines études suggèrent que le RNAi serait également impliqué dans la régulation de la différenciation sexuelle par des mécanismes moléculaires encore inconnus (Carmichael et al., 2004).

Mes travaux de thèse ont porté sur la caractérisation du rôle du RNAi dans la régulation de la différenciation sexuelle chez *S. pombe*. Je me suis intéressée en particulier à l'implication du RNAi et de la formation d'hétérochromatine dans la régulation de gènes codant pour des acteurs essentiels de la différenciation.

Les trois chapitres qui suivent se proposent de faire un état des lieux de l'ensemble des connaissances nécessaires à la compréhension de mes travaux de recherche. Dans un premier chapitre je détaille la structure et la fonction de l'hétérochromatine chez *S. pombe*, tout en faisant brièvement un parallèle avec les données connues pour d'autres organismes eucaryotes. Après avoir décrit les mécanismes généraux du RNAi dans un second chapitre, je précise le rôle du RNAi dans la formation de l'hétérochromatine chez *S. pombe*. Enfin j'expose les mécanismes connus à ce jour pour être impliqués dans le processus de différenciation sexuelle de cette levure.

Chapitre I

Chromatine et régulations épigénétiques

1.1. Structure et fonction de la chromatine

L'acide désoxyribonucléique, plus connu sous le nom d'ADN (Figure 1A) est une macromolécule essentielle à la plupart des formes de vie connues, présente dans chacune des cellules constituant les organismes vivants. Cette molécule a été découverte en 1871 par le biologiste suisse Friedrich Miescher, (pour une revue historique, consulter Olins and Olins, 2003). L'ADN a pour principales fonctions de stocker et transmettre l'information génétique (Avery et al., 1944).

La molécule d'ADN étant très longue (environ 2m d'ADN étiré par cellule humaine), elle doit être compactée afin de pouvoir être contenue dans le noyau des cellules eucaryotes (quelques μm). L'ADN est ainsi associé à des protéines pour former une structure plus compacte, la chromatine chez les eucaryotes (Figure 1B), ou le nucléoïde chez les procaryotes. La mise en place de cette structure permet à la fois de condenser et protéger l'ADN, mais aussi d'organiser l'information génétique dans le noyau et de réguler son accessibilité aux différentes machineries cellulaires. Chez les eucaryotes, les protéines structurales de la chromatine sont les histones.

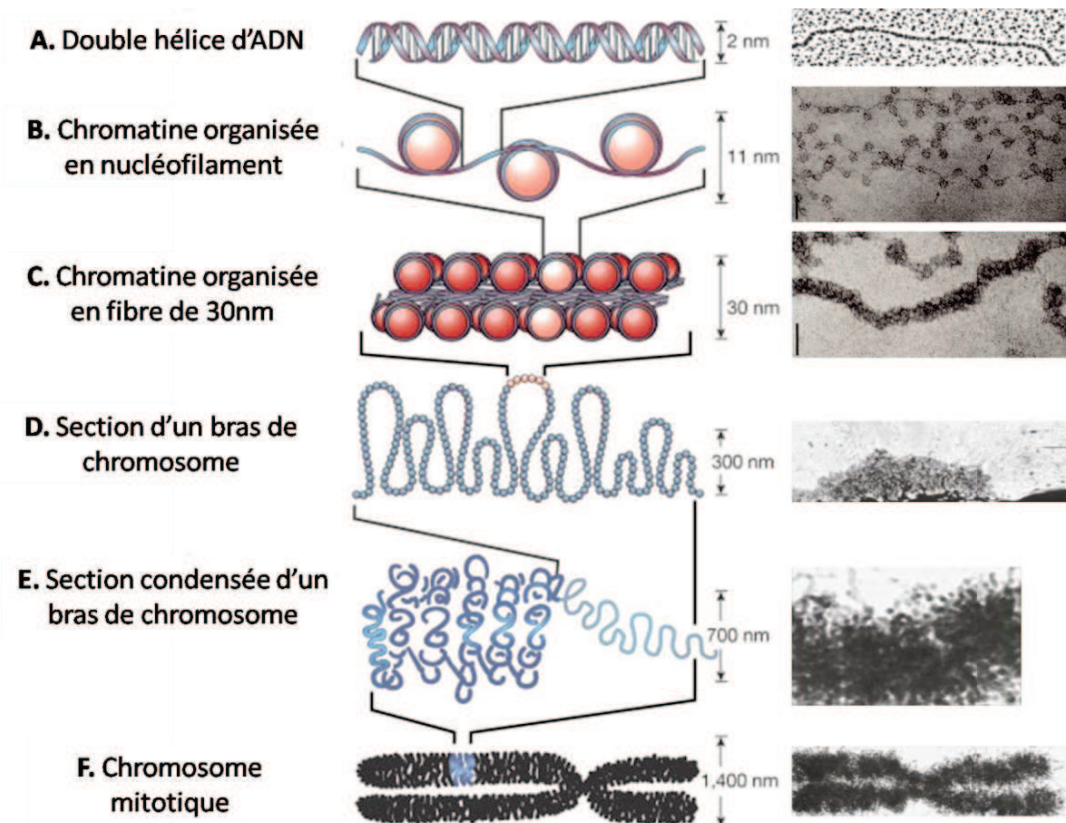


Figure 1. Les différents niveaux de compaction de l'ADN au chromosome mitotique : un schéma pour une image de microscopie électronique. Schéma adapté de Felsenfeld and Groudine, 2003. Images de microscopie électronique en transmission extraites de Pearson Education 2009 (A ; D ; E) ou de Olins and Olins, 2003 (B ; C ; F). **A/** La double hélice d'ADN. Le nucléofilament de chromatine (**B**) se condense en une fibre de 30nm (**C**) qui s'organise en boucles (**D**). Ces boucles se condensent sur elles-mêmes (**E**) à l'intérieur du chromosome mitotique (**F**).

1.1.1. Organisation structurale de la chromatine

Les histones sont des protéines basiques de petite taille (10 à 23 kilo Dalton (kD)) très conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes, et sont les constituants primaires de la chromatine. Elles sont également retrouvées chez les *Archaea*, et ne sont en revanche pas présentes chez les bactéries. L'ADN s'enroule autour d'un octamère protéique constitué, en règle générale, de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, pour former le nucléosome de cœur, l'unité de base et répétitive de la chromatine (Luger et al., 1997, Figure 2A et B). Chaque nucléosome de cœur contient 145 à 147 paires de bases (pb) d'ADN, et se retrouve toutes les 200 +/- 40pb le long du génome. Ces cœurs sont stabilisés par l'histone H1, une histone de liaison permettant de les relier entre eux. L'ensemble constitue

ainsi le nucléosome (Figure 2C), et induit une compaction de l'ADN d'un facteur 30 à 40 (Luger et al., 1997).

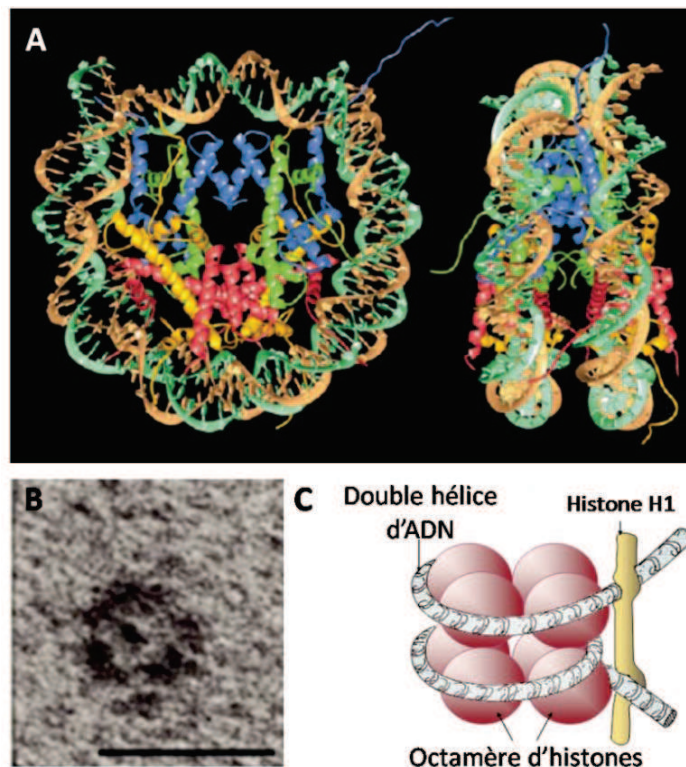


Figure 2. Le nucléosome : le cœur du nucléosome, l'ADN et l'histone de liaison. **A/** Structure cristallographique du cœur du nucléosome résolue par diffraction aux rayons X, à la résolution de 2,8 angströms. Les 146 pb d'ADN (un brin en marron, l'autre en vert clair), s'enroulent autour des huit histones de cœur (H2A en jaune ; H2B en rouge ; H3 en bleu ; H4 en vert). Les queues N-terminales des histones dépassent à l'extérieur du cœur nucléosomal. D'après Luger et al., 1997). **B/** Mononucléosome isolé à partir de chromatine de cellules eucaryotes digérée par des nucléases. Marqueur de taille : 10 nm. Images de microscopie électronique en transmission extraites de Olins and Olins, 2003. **C/** Représentation schématique d'un nucléosome, avec la double hélice d'ADN entourant l'octamère d'histone, l'ADN et l'histone de liaison H1. D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/2_cycle_cellule.htm

L'enchaînement des nucléosomes constitue une fibre de 11nm de diamètre, le nucléofilament (Figure 1B), qui représente le premier niveau de compaction de la chromatine. Le nucléofilament peut subir des niveaux de compaction supplémentaires, selon l'avancement du cycle cellulaire (interphase ou mitose), ou son activité (réplication ou transcription). Dans le noyau interphasique, il se condense pour former une fibre de 30nm de diamètre (Figure 1C), qui peut s'organiser en boucles plus ou moins repliées (Figure 1D). Le chromosome métaphasique représente le niveau de compaction ultime (Figure 1 D à F).

1.1.2. Organisation spatio-fonctionnelle de la chromatine : euchromatine et hétérochromatine

En 1928, le généticien E. Heitz établit la distinction entre deux types de chromatine, sur la base d'observation de régions plus ou moins denses au sein du noyau en interphase du cycle cellulaire (Figure 3). Les régions denses localisées en périphérie du nucléole et du noyau, sous la membrane nucléaire correspondent à l'hétérochromatine (Figure 3, et Rae and Franke, 1972 ; Sparvoli et al., 1977), par opposition à l'euchromatine, qui adopte une structure peu condensée (Figure 3), donc plus accessible. Ces deux structures spécialisées de la chromatine assurent chacune des fonctions qui leur sont propres, et se distinguent au niveau moléculaire par la composition biochimique de leurs nucléosomes (type d'histone, modifications biochimiques) et par leurs protéines non histones associées.

L'euchromatine est enrichie en gènes codants, et elle est plutôt active au niveau transcriptionnel. A l'inverse, l'hétérochromatine est plutôt riche en séquences non codantes. Son état de compaction élevé implique un arrangement très structuré des nucléosomes maintenu tout au long du cycle cellulaire, ce qui vaut à l'ADN d'être répliqué en général plus tard que l'ADN des régions d'euchromatine lors de la phase S, et d'être préservé des événements de recombinaison méiotique. Les régions d'hétérochromatine sont maintenues dans un état transcriptionnel globalement inactif communément appelé « silencing » transcriptionnel (Grewal and Elgin, 2007 ; Bannister and Kouzarides, 2011).

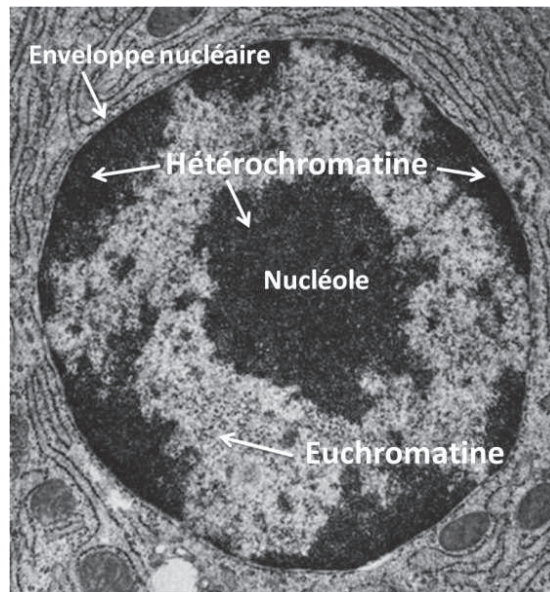


Figure 3. Organisation de la chromatine eucaryote en deux domaines distincts : l'euchromatine, et l'hétérochromatine. Image de microscopie électronique en transmission du noyau d'un plasmocyte issu de la moelle osseuse de cobaye. L'hétérochromatine se regroupe dans des domaines autour du nucléole, et sous la membrane nucléaire, et apparaît plus dense que l'euchromatine. Image tirée de Fawcett, 1981.

La mise en place des différents niveaux de compaction de la chromatine influe directement sur l'accessibilité des machineries moléculaires de la transcription, la réplication ou la réparation à l'ADN. Elle doit donc être finement régulée, afin de permettre un accès sans trop exposer l'ADN. Ainsi, la chromatine est une structure dynamique soumise à de nombreuses modifications biochimiques et structurales. Sa dynamique peut être contrôlée par différents mécanismes dits épigénétiques.

1.1.3. Epigénétique et mécanismes impliqués dans la dynamique de la chromatine

Les mécanismes impliqués dans la dynamique du nucléosome peuvent être regroupés sous le terme de mécanismes épigénétiques. La définition du terme épigénétique est en constante évolution depuis sa création par C.H. Waddington en 1942 (Waddington, 1942). Celui-ci désignait comme épigénétiques les mécanismes auxiliaires impliqués dans la régulation de l'expression génique, permettant d'expliquer les différences de phénotypes entre deux cellules différentes ayant le même génotype. Cette définition a par la suite été

restreinte aux mécanismes dont les manifestations sont capables d'être transmises au cours de la mitose ou de la méiose, notamment suite aux observations du caractère héritable de la méthylation de l'ADN (voir la suite).

Dans le cadre de ce présent manuscrit, le terme épigénétique désigne l'étude de tout processus répondant à la définition donnée par R. Bonasio ; S. Tu ; et D. Reinberg dans la revue publiée en 2010 dans le journal Science : l'épigénétique représente les variations d'expression génique sans changements dans la séquence d'ADN, héritable de génération en génération, par les processus de mitose et de méiose (Bonasio et al., 2010). L'ensemble des informations épigénétiques présentes au sein d'une cellule constitue son épigénome. Cet épigénome permet de moduler l'expression de l'ensemble des gènes présents dans le génome. Il est propre à chaque cellule, et ne s'établit pas de manière aléatoire : il serait défini par le type cellulaire (Fisher and Fisher, 2011), les conditions environnementales, ou encore l'état physiologique de la cellule. Il est mis en place et modifié à façon, par l'intermédiaire des mécanismes décrits dans la suite de ce manuscrit, les plus connus faisant intervenir le remplacement d'histones ou de variants d'histones, les facteurs de remodelage dépendants d'ATP, des facteurs induisant des modifications covalentes de la chromatine ou de l'ADN ou des ARN non codants (ARNnc).

1.1.3.1. Mécanismes d'assemblage et de remodelage du nucléosome

Les mécanismes d'assemblage du nucléosome interviennent essentiellement au cours de la réplication et font appel à des protéines chaperonnes induisant l'association de l'octamère d'histones, et sa déposition le long de l'ADN. De nombreuses chaperonnes ont été identifiées et seraient relativement conservées, telles que les nucléoplasmines, impliquées dans le stockage des histones, les NAP (Nucleosome Assembly Protein) qui jouent un rôle dans le transfert des histones du cytoplasme vers le noyau, les FACT (Facilitates Chromatin Transcription), les CAF (Chromatin Assembly Factor) qui interviennent spécifiquement lors de la réplication, les HIRA (Histone Regulation) agissant de manière indépendante de la réplication, ou encore Asf1 (pour revue, voir Loyola and Almouzni, 2004).

Les chaperonnes peuvent également incorporer dans le nucléosome des histones considérées comme non conventionnelles, notamment car elles sont moins représentées

dans l'ensemble du génome que les histones canoniques décrites dans le paragraphe précédent. Ces variants d'histones sont des isoformes non alléliques des histones canoniques, exprimés eux aussi de manière constitutive. Des variants ont été identifiés chez tous les eucaryotes et pour toutes les classes d'histones, bien que certains d'entre eux soient restreints à quelques espèces eucaryotes. La présence de variants est liée à une modification des propriétés biochimiques du nucléosome et influe sur la compaction de la chromatine (Li and Reinberg, 2011). On les retrouve associés à la chromatine de régions particulières des chromosomes tels que les centromères (voir le paragraphe suivant 1.2), ou dans des contextes spécifiques comme au niveau des lésions de l'ADN. Certains sont propres à un type cellulaire, comme TH2B pour les cellules sexuelles males chez les mammifères (Brock et al., 1980 ; et Zalensky et al., 2002). Ils joueraient ainsi un rôle important dans les processus de réparation de l'ADN, de recombinaison méiotique, de ségrégation des chromosomes, d'initiation et de terminaison de la transcription. Chez les mammifères, ils sont également impliqués dans la condensation des chromosomes sexuels et de la chromatine spermatique (Talbert and Henikoff, 2010) ou dans le développement précoce de l'embryon (Santenard and Torres-Padilla, 2009).

Pour permettre l'accès à l'ADN des différentes machineries de la réplication, la transcription ou la réparation de l'ADN, les nucléosomes doivent être déplacés ou éjectés. Le transfert des nucléosomes le long de l'ADN est assuré par les facteurs de remodelage de la chromatine (Cairns, 2007). Ces facteurs peuvent également induire l'éjection d'un nucléosome ou l'échange d'histones. Ils sont conservés, et agissent au sein de complexes protéiques présentant une sous-unité à activité ATPase (hydrolyse de l'ATP), nécessaire à l'altération des interactions entre l'ADN et les histones. On distingue quatre familles de facteurs de remodelage en fonction de leur sous unité catalytique, leur induisant des spécificités fonctionnelles : les complexes SWI/SNF (Switching defective /Sucrose Non Fermenting), ISWI (Imitation Switch), CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding), et Ino80 (Inositol requiring 80). Les complexes SWI/SNF induisent un positionnement aléatoire des nucléosomes le long de la chromatine et peuvent provoquer leur éjection. Les ISWI sont plutôt spécialisées dans le réarrangement régulier après la réplication ou la transcription. La famille des CHD joue un rôle dans l'activation ou la répression de la transcription, et celle des Ino80-SWR1 est impliquée dans la réparation et la réplication de l'ADN, l'activation de la transcription, et la mise en place de variants d'histone (Clapier and Cairns, 2009).

1.1.3.2. Modifications post-traductionnelles des histones et protéines associées

Les queues N-terminales des histones sont sujettes à de nombreuses modifications biochimiques covalentes, réversibles et catalysées par des enzymes spécifiques. Parmi ces modifications post-traductionnelles sont retrouvées l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, ou encore l'ubiquitination, affectant différents acides aminés (Figure 4 A et B). Les modifications les plus connues sont l'acétylation, mise en place par des HAT (Histones Acétyl-Transférase), et enlevée par les HDAC (Histone Déacétylase), et la méthylation, affectant plus particulièrement les lysines et les arginines, et catalysée par les HMT (Histone Méthyltransférases). Ces résidus peuvent subir jusqu'à trois méthylations successives : on parle de mono-, di-, ou tri-méthylation (Bannister and Kouzarides, 2011).

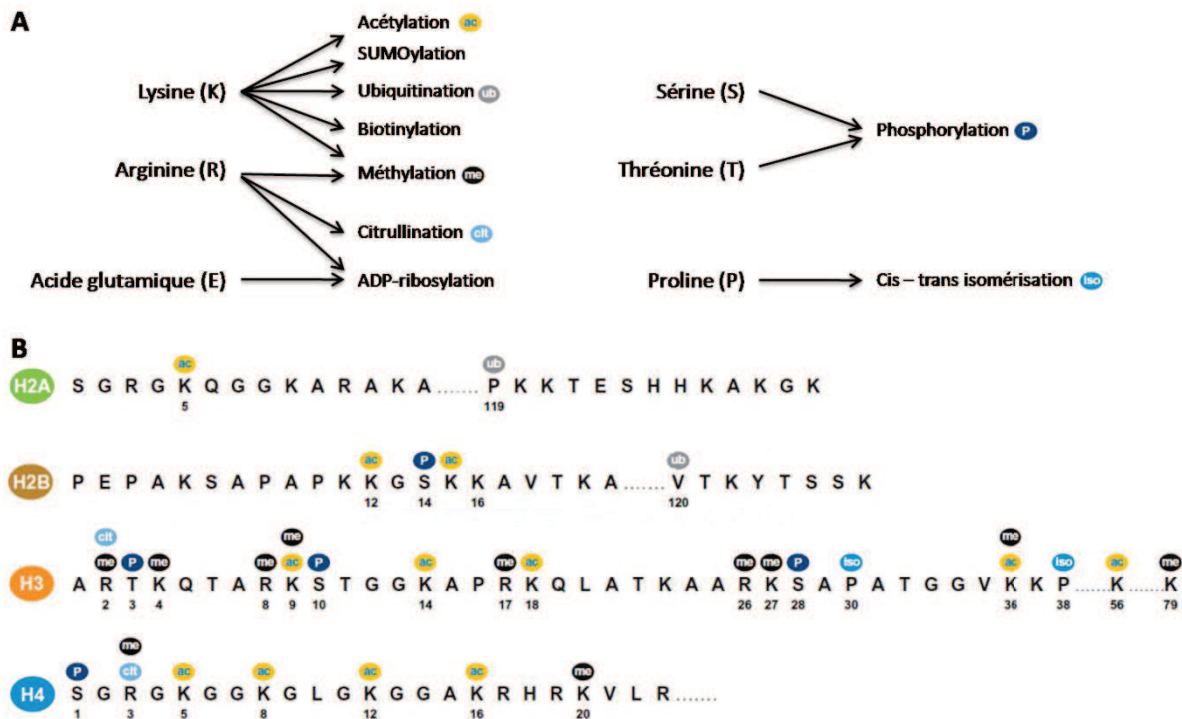


Figure 4. Les modifications post-traductionnelles des histones. A/ Les différentes modifications post-traductionnelles des histones et les acides aminés concernés. B/ Représentation schématique de la séquence en acides aminés des queues N-terminales des histones et de leurs principales modifications post-traductionnelles associées (cercles colorés : chaque couleur correspond à une modification, décrite dans A). Adapté de Abcam.com.

De manière générale, la présence de ces modifications influencerait sur le taux de compaction de la chromatine. Ainsi, l'ubiquitination induit un encombrement stérique et l'acétylation ou la phosphorylation induisent une modification des charges électrostatiques

des histones, ce qui pourrait potentiellement altérer leurs propriétés structurales (Li and Reinberg, 2011).

Ces modifications peuvent également orchestrer le recrutement ordonné de complexes enzymatiques manipulant la chromatine. En effet, elles peuvent se comporter comme des sites de reconnaissance induisant, ou inhibant, le recrutement de différents complexes sur la chromatine, de façon souvent exclusive (Bannister and Kouzarides, 2011). Une fois recrutées, les protéines pourvues de domaines de reconnaissance de ces modifications d'histones peuvent soit modifier directement la chromatine, lorsqu'elles possèdent une activité enzymatique, soit induire le recrutement d'autres protéines régulatrices. Par exemple, les protéines possédant un bromodomaine sont capables de reconnaître spécifiquement les histones présentant une lysine acétylée, comme les facteurs de remodelage SWI/SNF, qui interagissent avec la lysine 14 de l'histone H3 lorsque celle-ci est acétylée (H3K14ac). Les protéines à chromodomaine se lient spécifiquement à une lysine méthylée, tels que les facteurs de remodelage CHD reconnaissant la méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), les protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1 ; Figure 11) s'associant à la di- ou tri-méthylation d'H3K9 (H3K9me₂₋₃), ou les protéines Polycomb, dont certaines peuvent interagir avec H3K9me₃ et d'autres avec H3K27me₃ (Bannister et al., 2001 ; Jenuwein and Allis, 2001 ; Fischle et al., 2003). Les protéines HP1 sont des protéines spécifiques de l'hétérochromatine, conservées au cours de l'évolution des eucaryotes, et qui jouent un rôle important dans la mise en place du « silencing » transcriptionnel. Elles sont impliquées notamment dans la compaction et le recrutement de protéines modificatrices de la chromatine. Trois isoformes ont été identifiées chez les mammifères, HP1 α , β et γ , et deux chez *S. pombe*, Swi6 (Switching gene 6), et Chp2 (Chromodomain gene in *S. pombe* 2 ; voir les paragraphes suivants ; Maison and Almouzni, 2004 ; Zeng et al., 2010). Les protéines de type Polycomb constituent une classe assez hétérogène de protéines importantes pour l'hétérochromatine, retrouvées essentiellement chez les drosophiles, les nématodes, les plantes et les mammifères. Elles sont impliquées dans la répression de l'expression de gènes essentiels au développement, comme des gènes de la différenciation cellulaire. Elles s'associent au sein de différents complexes, comme PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressive Complex) chez les mammifères, qui induisent respectivement l'ubiquitination de H2AK119 et la méthylation de H3K27, ainsi que la compaction de la chromatine (Beisel and Paro, 2011).

Les modifications des histones présentes au sein d'un nucléosome peuvent interférer les unes avec les autres (Figure 5 et Latham and Dent, 2007). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 de H3 déstabilise l'interaction entre HP1 et H3K9me lors de la mitose (Fischle et al., 2005). Chaque combinaison pourrait être lue par des protéines spécifiques, selon un code, ainsi nommé le code histone (Strahl and Allis, 2000). De cette façon, les modifications d'histones influenceraient l'activité des machineries de transcription, ainsi que des processus de la réplication, la réparation, la recombinaison, ou encore le maintien de la stabilité du génome et la ségrégation des chromosomes, par l'intermédiaire de mécanismes encore peu connus (Kouzarides, 2007 ; Bannister and Kouzarides, 2011).

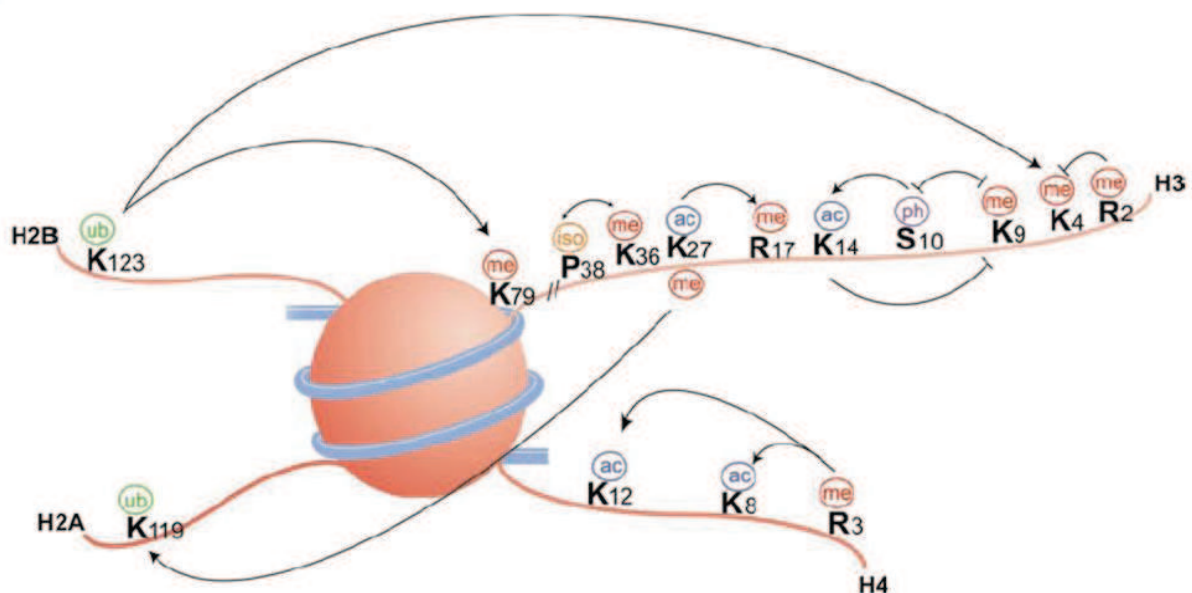


Figure 5. La communication inter et intra-moléculaire entre les modifications post-traductionnelles des histones. Représentation schématique des interactions fonctionnelles connues entre les différentes modifications post-traductionnelles des histones contenues dans un même nucléosome. D'après Bannister and Kouzarides, 2011.

1.1.3.3. Méthylation de l'ADN

L'ADN est lui aussi sujet à des modifications biochimiques, la plus connue étant la méthylation des cytosines sur le carbone en position 5 donnant la 5-méthylcytosine, catalysée par les enzymes de la famille des ADN-méthyltransférases, ou DNMT (DNA Methyltransferase ; Goll and Bestor, 2005). Cette modification chimique est relativement

conservée au cours de l'évolution : on la retrouve chez la plupart des organismes étudiés des six règnes eucaryotes, et même chez certaines bactéries. Cependant, il est à noter que cette modification est absente du génome des modèles d'études eucaryotes classiques que sont le nématode *Caenorhabditis elegans*, et les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *S. pombe*, bien que des homologues catalytiquement morts d'ADN méthyltransférase soient présents dans le génome de certains de ces organismes (*pmt1* chez *S. pombe*, Wilkinson et al., 1995). La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, et elle est généralement associée à une répression de la transcription. Ainsi, cette marque est enrichie dans les régions d'hétérochromatine (Figure 7). La présence de cette modification affecte un grand nombre de processus biologiques, incluant la différenciation cellulaire, le développement de l'embryon, ou encore, la mise en place de l'empreinte génomique et l'inactivation du chromosome X (He et al., 2011 ; voir les paragraphes suivants). L'ADN méthylé pourrait établir des interactions fonctionnelles avec les histones, par l'intermédiaire du recrutement direct de protéines modificatrices de la chromatine, aboutissant ainsi à l'établissement interdépendant de modifications (Jenuwein and Allis, 2001 et Figure 6).

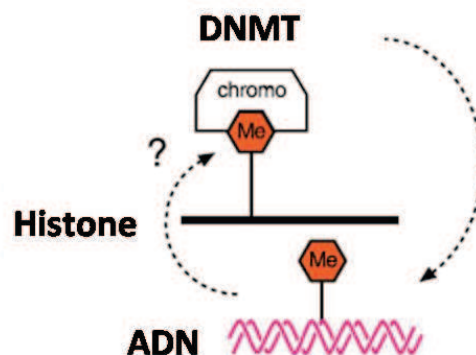


Figure 6. Interaction fonctionnelle entre des enzymes de modification des histones, et les ADN méthyltransférase (DNMT), potentiellement induites ou stabilisées par des combinaisons de modifications : exemple de la méthylation (panneau rouge) des histones, permettant le recrutement d'une DNMT à chromodomaine (boîte blanche « chromo »), conduisant ainsi à l'établissement de la méthylation (panneau rouge) de l'ADN. Schéma adapté de Jenuwein and Allis, 2001.

La répartition des différentes modifications d'histone et de la méthylation de l'ADN dans le génome est assez bien définie, et permet de caractériser de manière globale les deux différents types majeurs de chromatine que sont l'hétérochromatine et l'euchromatine. Ainsi, certaines marques s'associent plus spécifiquement à des régions d'euchromatine, alors

que d'autres sont plutôt enrichies dans les régions d'hétérochromatine. Cependant, l'hétérochromatine et l'euchromatine peuvent également être divisées en plusieurs sous-types, en fonction des marques qui leur sont associées (Filion et al., 2010 ; Roudier et al., 2011). De manière générale, l'euchromatine des mammifères est caractérisée par la présence de modifications décrites comme favorables à la transcription, telles que la méthylation des lysines 4 et 36 de l'histone H3. Par ailleurs, les histones associées aux régions de l'euchromatine présentent un fort taux d'acétylation, particulièrement au niveau des lysines des histones H3 (H3K9ac et H3K14ac) et H4 (lysines 5 ; 8 ; 12 ; et 16 ; Figure 7A ; Yan and Boyd, 2006). L'ADN de ces régions est quant à lui peu méthylé. Chez les mammifères, l'hétérochromatine est caractérisée au niveau moléculaire par une hyperméthylation de l'ADN, un faible taux d'acétylation des histones, la di- ou la tri-méthylation des lysines H3K9, marque répressive de la transcription à laquelle s'associe HP1 (Bannister et al., 2001 ; Maison and Almouzni, 2004) et, selon les types d'hétérochromatine, par un enrichissement des marques H4K20me3 et H3K27me3, auxquelles s'associent d'autres protéines répressives à chromodomaine comme les Polycomb, et la présence d'ARNnc (Figure 7B ; Peters et al., 2003).

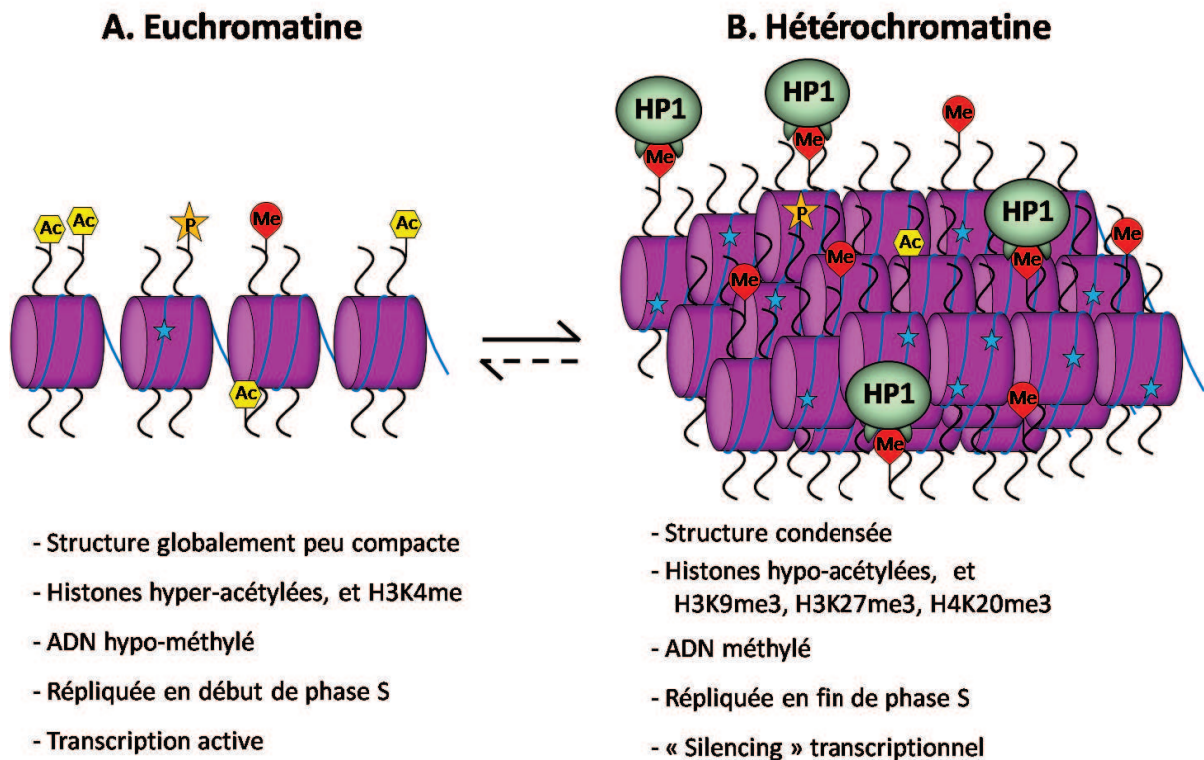


Figure 7. Représentation schématique de l'euchromatine (A) et de l'hétérochromatine (B). La chromatine est une fibre de nucléosomes accessible ou condensée, contenant des marques

épigénétiques spécifiques des histones (cylindres violets) : acétylation (panneau jaune Ac), méthylation (cercle rouge Me) et phosphorylation (étoile orange P), ou de l'ADN (hélicoïdes bleus) : méthylation (étoile bleue). La protéine HP1 (forme verte) est recrutée sur H3K9me2-3.

1.2. L'hétérochromatine

L'hétérochromatine peut être classée en deux sous-types majeurs : l'hétérochromatine constitutive, ou facultative. L'hétérochromatine constitutive se forme au niveau de loci génomiques contenant généralement une forte concentration en séquences d'ADN répétées et non codantes pour y imposer un « silencing » transcriptionnel et épigénétique (Birchler et al., 2000 ; Beisel and Paro, 2011). Chez les eucaryotes, les sites d'hétérochromatine constitutive majeurs du génome sont les régions péri-centromériques et subtélomériques des chromosomes (Figure 8).

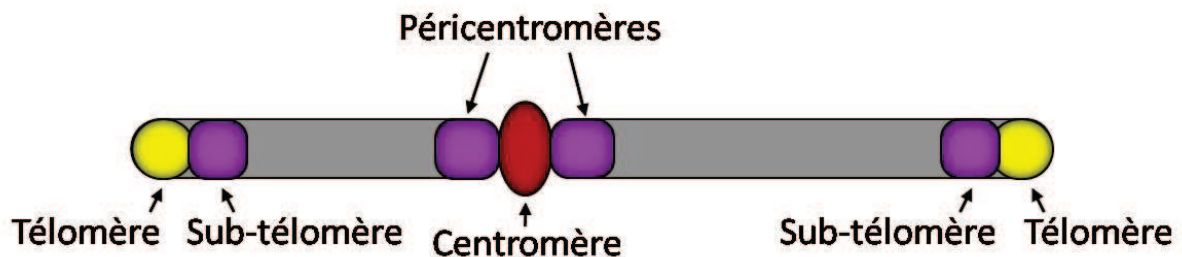


Figure 8. L'hétérochromatine constitutive. Représentation schématique des régions d'hétérochromatine constitutive d'une chromatide d'un chromosome eucaryote (formes violettes).

La levure fissipare unicellulaire *S. pombe* est un modèle d'étude des mécanismes de formation d'hétérochromatine constitutive. Son génome, réparti sur trois chromosomes, a été entièrement séquencé en 2002, ce qui a permis de caractériser les différentes régions d'hétérochromatine (Wood et al., 2002), et la mise en place de nombreuses banques de données. *S. pombe* présente une région d'hétérochromatine constitutive supplémentaire à celles des péri-centromères et des subtélomères, retrouvée au niveau d'un locus particulier situé sur le chromosome II, la région du déterminisme sexuel (ou *mat* pour mating type region).

Dans ce paragraphe, la structure, la fonction, et les mécanismes de formation de ces régions d'hétérochromatine sont brièvement décrits pour les eucaryotes supérieurs, et sont présentés de manière plus détaillée chez *S. pombe*. Bien que la chromatine des centromères et des télomères ne présente pas la même composition en terme de nucléosome que l'hétérochromatine, l'ADN de ces régions est également enrichi en séquences répétées subissant un « silencing » constitutif. Leurs caractéristiques sont également abordées dans ce paragraphe aux côtés de l'hétérochromatine, car ces structures assurent des fonctions en commun.

1.2.1. L'hétérochromatine constitutive

1.2.1.1. La chromatine centromérique et l'hétérochromatine péricentromérique

Bien qu'en terme de séquence, les régions centromériques aient été très peu conservées au cours de l'évolution (Figure 9), l'organisation générale et la fonction de ces domaines sont très comparables. Du point de vue épigénétique, quelques caractéristiques communes à tous les eucaryotes ont été mises en évidence, telles que la présence de Cenp-A (Centromere protein A), un variant de l'histone H3, au niveau des centromères ou des protéines HP1 et de H3k9me2-3 au niveau des régions péricentromériques (Buscaino et al., 2010).

i) Localisation dans le noyau

Chez les mammifères, les centromères et régions péricentromériques sont regroupés dans des foyers, les chromocentres (Taddei et al., 2004).

Chez *S. pombe*, les centromères des trois chromosomes s'associent en un foyer principal localisé à proximité de l'appareil moléculaire équivalent du centrosome chez les eucaryotes supérieurs (le « spindle pole body » chez la levure), à la périphérie du noyau (Funabiki et al., 1993).

ii) Composition

Les régions centromériques et péricentromériques de la plupart des eucaryotes sont constituées de séquences répétées dont l'organisation est conservée (Figure 9). Le type de séquences est propre à chaque espèce (Cleveland et al., 2003 ; Buscaino et al., 2010).

Chez la mouche *Drosophila melanogaster* les centromères sont constitués de séquences répétées simples, et l'hétérochromatine péricentromérique contient des séquences de type satellites (Figure 9). Chez les plantes et les mammifères les séquences répétées de type satellites sont majoritaires (Ma et al., 2007 ; Plohl et al., 2008 ; Figure 9). Celles-ci sont des séquences non codantes constituées d'une succession répétée de motifs unitaires (de quelques pb à plus de 1000pb), chacun étant positionné en tandem par rapport au motif adjacent (Plohl et al., 2008).

On retrouve également au niveau de ces régions d'hétérochromatine des éléments mobiles, les transposons (Lander et al., 2001 ; Schueler and Sullivan, 2006). Les transposons sont des séquences capables de se déplacer, sous forme d'ADN (transposons à ADN) ou d'ARN (rétro-élément), et de s'insérer dans le génome, causant ainsi l'apparition de mutations, de cassures d'ADN, et d'évènements de recombinaison illégitimes (Konkel and Batzer, 2010). Certains sont autonomes : ils sont constitués de cadres de lecture (ORF) codant pour des enzymes à activité de transposase, ou de transcriptase inverse. Ils sont particulièrement abondants dans les péricentromères des plantes et des drosophiles, favorisant ainsi leur inactivation par le « silencing » transcriptionnel inhérent à la structure d'hétérochromatine (Slotkin and Martienssen, 2007).

La structure des centromères de *S. cerevisiae* est un cas particulier. Elle est détentrice de régions centromériques à l'organisation apparente très simplifiée et divergente par rapport aux autres eucaryotes. Ces centromères sont de petite taille (un seul nucléosome), et ne contiennent pas de séquences répétées mais des séquences non codantes riches en nucléotides de type A et T (Figure 9). Les protéines caractéristiques telles que HP1 seraient absentes de cette structure. Cependant les fonctions assurées par cette structure seraient les mêmes que chez les autres eucaryotes, notamment par l'intermédiaire de Cenp-A (Cse4 chez *cerevisiae* ; Stoler et al., 1995 ; voir ci-après).

La chromatine au niveau des centromères (centromere core region ou *cnt*) des trois chromosomes de *S. pombe* est caractérisée par des nucléosomes enrichis en Cnp1, l'homologue du variant d'histone Cenp-A chez les mammifères. Le centromère est encadré de part et d'autre par deux ou trois domaines répétés inversés, les domaines *imr* (innermost repeat), le domaine *otr* (outer repeat, Figures 9 et 10), ce dernier contenant deux types de séquences répétées, *dg* et *dh*, et le domaine IRC (Inverted Repeat Centromere ; pour les chromosomes 1 et 3) (Figure 10). Les domaines IRC, *otr*, et une partie du domaine *imr* sont associés à la marque H3k9me2-3 et aux protéines clés de l'hétérochromatine Swi6 et Chp2 (homologues de HP1), ainsi que Chp1 (Chromodomain gene in *S. pombe* 1), une autre protéine à chromodomaine essentielle à cette structure. Toutes ces séquences sont maintenues dans un état de « silencing ». La transition entre cette hétérochromatine et l'euchromatine est marquée par le domaine IRC (pour les chromosomes 1 et 3) et la présence de séquences codant pour des ARN de transfert (Cam et al., 2005).

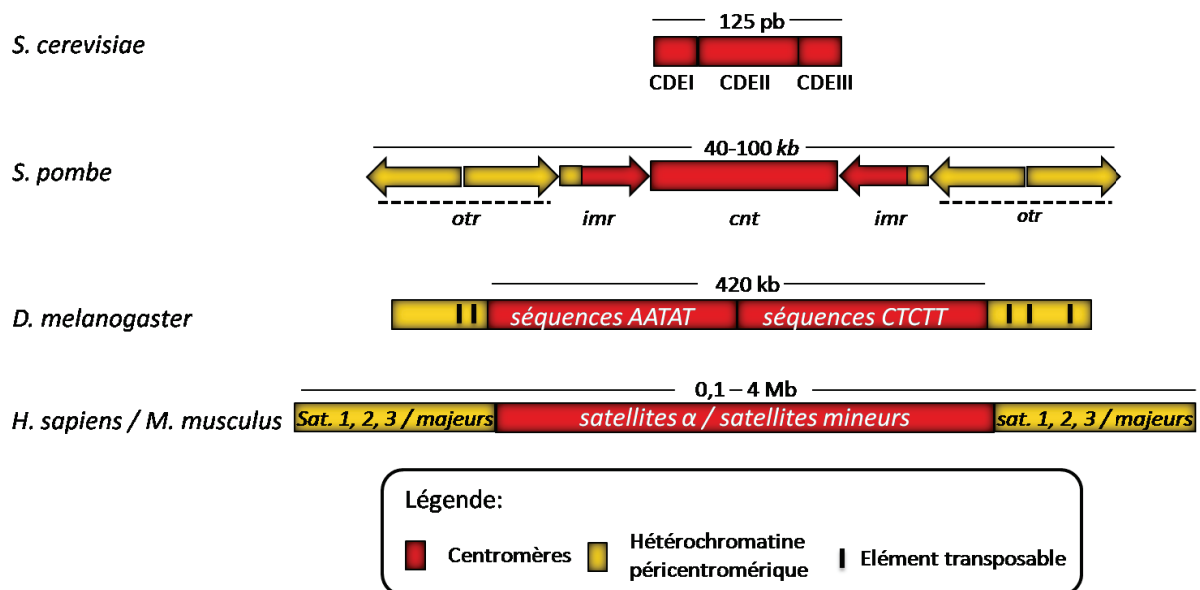


Figure 9. Organisation des domaines centromériques et péri-centromériques chez différents eucaryotes modèles. Schéma de la structure type des centromères, enrichis en Cenp-A (rouge) et péri-centromères (jaune) chez quelques organismes eucaryotes modèles. De haut en bas : La chromatine centromérique de *Saccharomyces cerevisiae* est composée de trois domaines CDE (Centromere DNA Element), d'une taille totale d'environ 125 pb. Chez *Schizosaccharomyces pombe* le centromère contenant les éléments *cnt* (centromère) et une partie des séquences répétées *imr* (innermost repeat), est flanqué de part et d'autre par de l'hétérochromatine péri-centromérique contenant les séquences répétées *otr* (outer repeat, flèches jaunes). Chez *Drosophila melanogaster*, le centromère est enrichi en séquences répétées AATAT et CTCTT et l'hétérochromatine

péricentromérique contient des séquences satellites et de transposons (boîtes noires). L'ensemble des domaines centromériques et péricentromériques chez *Homo sapiens* présente une taille moyenne allant de 0,1 à 4Mb. La chromatine centromérique est essentiellement constituée de séquences d'ADN satellites α , et l'hétérochromatine péricentromérique contient plutôt des satellites 1 ; 2 ou 3. *Mus musculus*: les centromères contiennent essentiellement des séquences satellites dits mineurs, les péricentromères sont eux enrichis en satellites majeurs. Les séquences satellites se différencient en fonction du motif de base qui les constitue.

iii) Fonction

La structure de ces régions permet de maintenir toutes ces séquences répétées ou transposables dans un état transcriptionnel globalement inactif afin de maintenir la stabilité du génome, et de limiter les événements de recombinaison (Grewal and Elgin, 2007 ; Beisel and Paro, 2011).

La chromatine centromérique et péricentromérique joue également un rôle important et conservé au cours de l'évolution dans la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire. L'absence de Cnp1/Cenp-A, Swi6/HP1 ou d'autres marques épigénétiques propres à ces régions provoque des défauts majeurs de ségrégation des chromosomes (Kellum and Alberts, 1995 ; Allshire et al., 1995 ; Bernard et al., 2001 ; Black et al., 2007). La ségrégation des chromosomes est assurée, entre autres, par les complexes protéiques des cohésines et des kinétochores, qui se mettent en place au niveau de la chromatine des centromères et péricentromères des chromosomes mitotiques (Cleveland et al., 2003 ; Schueler and Sullivan, 2006). Après la réplication, les chromatides sœurs sont associées l'une à l'autre par l'intermédiaires des cohésines qui seraient recrutées au niveau des péricentromères par Swi6/HP1 (Bernard et al., 2001 ; Nonaka et al., 2002). Swi6/HP1 et Cenp-A faciliteraient également le recrutement des protéines du kinétochore aux centromères (Obuse et al., 2004) qui permet de maintenir les chromosomes au niveau du plan métaphasique et d'effectuer le lien entre les chromosomes mitotiques et les microtubules. A la transition métaphase/anaphase, les cohésines sont inactivées, en partie suite à la phosphorylation de la sérine 10 de H3 induisant la libération de Swi6/HP1, permettant ainsi la séparation des chromatides sœurs (Mateescu et al., 2004 ; Fischle et al., 2005 ; Kloc and Martienssen, 2008).

La chromatine centromérique et péricentromérique est également impliquée dans la ségrégation des chromosomes lors de la méiose (Dernburg et al., 1996 ; Brar and Amon, 2008). Des travaux récents réalisés chez *S. pombe* mettent en évidence l'importance d'une nouvelle modification d'histone, la phosphorylation de H2A-S121, qui serait établie spécifiquement au niveau des péricentromères lors de la méiose et de la mitose par la protéine très conservée Bub1 (Kawashima et al., 2010). La présence de cette marque (Kawashima et al., 2010), et de Swi6/HP1 (Yamagishi et al., 2008), permettrait le recrutement des protéines Shugoshin connues pour leur rôle dans la protection des cohésines centromériques lors de la mitose et la méiose. L'absence de Shugoshin conduit à des défauts de ségrégation des chromosomes (Javerzat, 2010 ; Clift and Marston, 2011). Ces travaux montrent par ailleurs que ce mécanisme serait conservé chez *S. cerevisiae*, et chez l'homme (Yamagishi et al., 2008 ; Kawashima et al., 2010). Par ailleurs, la mise en place d'une structure répressive au niveau de ces régions joue un rôle essentiel dans l'inhibition d'événements de recombinaison au niveau des centromères lors de la méiose (Ellermeier et al., 2010).

1.2.1.2. La chromatine télomérique et l'hétérochromatine subtélomérique

Chez les mammifères, les télomères seraient distribués de manière aléatoire au sein du noyau (Luderus, 1996). Chez *S. pombe*, et *S. cerevisiae* les télomères se regroupent en quelques foyers situés à la périphérie de l'enveloppe nucléaire (Funabiki et al., 1993 ; Gotta and Gasser, 1996).

Situés aux extrémités des chromosomes, les télomères sont caractérisés par des répétitions d'une séquence variable selon les espèces, reconnues et liées par des protéines spécifiques jouant un rôle important dans la régulation de la télomérase. La télomérase est un complexe ribonucléo-protéique essentiel pour la protection des télomères. Après chaque division cellulaire, elle rajoute ces séquences répétées aux extrémités grâce à son activité de transcriptase inverse, limitant ainsi le raccourcissement des chromosomes (Dehe and Cooper, 2010 ; Martinez and Blasco, 2011). L'hétérochromatine subtélomérique est constituée d'une partie des régions situées en amont des télomères, appelées domaines subtélomériques (Figure 8).

Les télomères de *S. pombe* sont constitués d'une région télomérique d'environ 300pb, enrichie en une séquence répétée spécifique (5'-GGTTAC-3'), et associée à différents complexes protéiques impliqués dans la protection des extrémités des chromosomes et le « silencing » de ces séquences (Dehe and Cooper, 2010). La structure d'hétérochromatine caractérisée par la présence de la marque H3K9me2-3 et des protéines Swi6, Chp1 et Chp2 est retrouvée au niveau de régions subtélomériques d'environ 19kb des chromosomes I et II. Une région de forte homologie avec la séquence répétée *dh* permettant la formation d'hétérochromatine est présente dans l'ORF (Open Reading Frame, ou cadre de lecture ouvert) d'un gène codant pour une hélicase à ADN de la famille RecQ (Mandell et al., 2005). Plusieurs copies de ce gène plus ou moins complètes ont été identifiées au niveau des régions subtélomériques des bras gauches et droits des chromosomes I et II (*tlh1* dans le subtélomère I, Figure 10 ; et *tlh2* dans le subtélomère II ; Wood et al., 2002 ; Mandell et al., 2005). Ces gènes sont ainsi maintenus dans un état de « silencing » transcriptionnel lié à l'hétérochromatine, et seraient activés lors d'un raccourcissement des télomères altérant la structure d'hétérochromatine, afin de mettre en place un mécanisme de maintenance des télomères indépendant de la télomérase (Mandell et al., 2005).

La structure des télomères et des sub-télomères joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'ADN des extrémités des chromosomes, particulièrement exposé aux activités cellulaires de dégradation et de recombinaison (Martinez and Blasco, 2011). Une altération de cette structure conduit à une instabilité génomique, et serait liée à des défauts mitotiques et méiotiques importants, notamment de ségrégation des chromosomes (Cooper et al., 1998 ; Tuzon et al., 2004 ; Martinez and Blasco, 2011).

1.2.1.3. L'hétérochromatine de la région du déterminisme sexuel chez *S. pombe*

Chez *S. pombe*, la région du déterminisme sexuel est constituée de trois loci: *mat1*, *mat2P*, et *mat3M*, comportant chacun deux gènes associés. Il existe deux types sexuels chez cette levure : le type P (Plus) et le type M (Minus), selon l'allèle présent dans le locus de *mat1*, soit *mat2P* soit *mat3M* respectivement. Le type sexuel est mis en place lors de la division cellulaire. Au cours de la réplication des chromosomes, cette région subit un important remaniement. Des mécanismes complexes favorisent la duplication et l'insertion par recombinaison au niveau du locus *mat1* d'un allèle *mat2P* pour donner une cellule fille

de type P, ou *mat3M* donnant lieu à une cellule fille de type M. Cette capacité de changer de type sexuel au grès des divisions cellulaires est propre aux levures homothaliques (pour revues : Broach, 2004 ; Egel, 2005).

Le locus *mat1* est le seul de ces trois loci à être actif, et il est situé en dehors de l'hétérochromatine. Les allèles donneurs *mat2P* et *mat3M* sont eux maintenus dans un état de « silencing » transcriptionnel lié à l'hétérochromatine, essentiel pour l'expression exclusive de *mat1* et la mise en place du type sexuel. Cette hétérochromatine se forme au niveau d'une région de 20kb comprenant les deux gènes *mat2P* et *mat3M*, ainsi que l'élément *cenH*, et des éléments répétés inversés IR, avec la mise en place de H3K9me et des protéines Swi6, Chp1 et Chp2 (Figure 10). L'élément *cenH* joue un rôle important dans la mise en place de cette structure, du fait de la forte homologie avec les séquences *dg* et *dh* des péricentromères (voir le chapitre II). Les éléments IR (Inverted Repeat) en constituent les frontières, de la même façon que les éléments IRC des péricentromères (Cam et al., 2005).

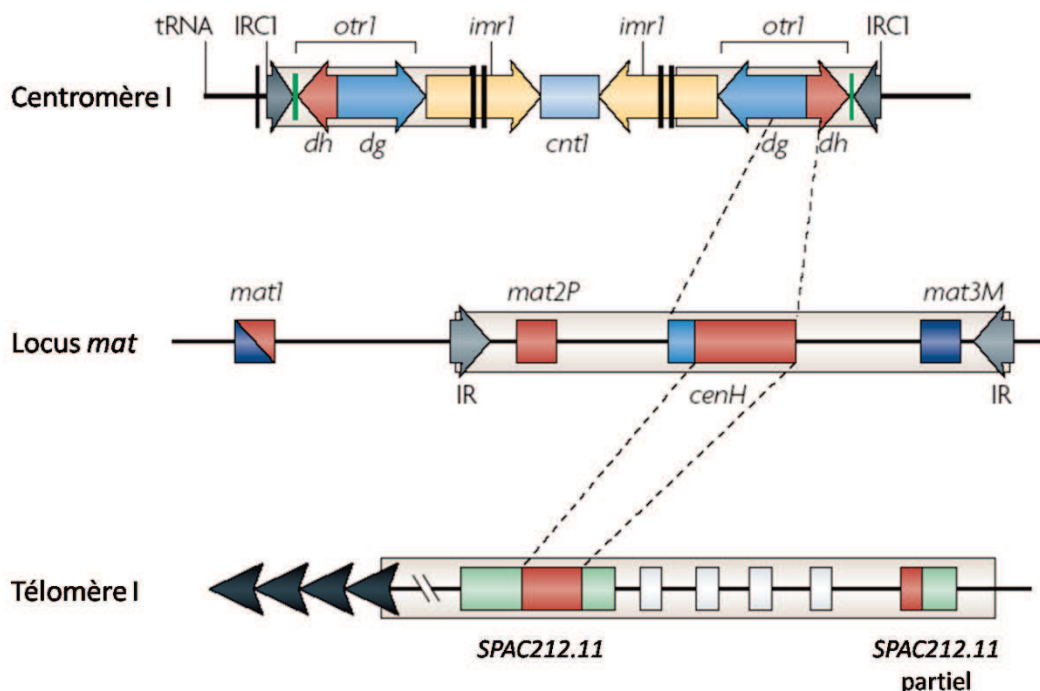


Figure 10. Organisation des trois régions d'hétérochromatine constitutive chez *S. pombe*, et des régions adjacentes. Représentation schématique de la structure du centromère du chromosome I (haut), de la région du déterminisme sexuel, et du télomère gauche du chromosome I. Les boîtes beiges signalent les régions d'hétérochromatine à proprement parler, c'est-à-dire dont la chromatine est enrichie pour les marques H3K9me2-3, et les protéines de type HP1. Les zones présentant une homologie de séquence avec *dg* (en rouge) et *dh* (en bleu) sont identifiées par les traits pointillés. Au niveau du télomère I, une région de forte homologie avec la séquence répétée *dh* est présente au

niveau du gène SPAC212.11 (*tlh1*), retrouvé sous la forme de plusieurs copies tronquées dans les subtelomères des chromosomes I et II. Les pointes de flèche noires symbolisent les éléments répétés propres aux télomères. Voir le texte pour plus de détails. Adapté de Grewal and Elgin, 2007.

1.2.2. L'hétérochromatine facultative

Dans un même organisme, certaines régions génomiques ont la capacité d'être présente sous la forme soit d'euchromatine, soit d'hétérochromatine, en fonction du type cellulaire, des conditions environnementales ou de l'étape du développement. Ces régions sont dites d'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine facultative concerne essentiellement les eucaryotes supérieurs. Elle se localise au niveau de régions contenant des gènes codants, tels que les gènes soumis à l'empreinte, pour lesquels seul un des deux allèles est réprimé (Hirasawa and Feil, 2010). Cette hétérochromatine peut même affecter un chromosome entier, tel que le chromosome X inactivé. L'inactivation d'un des deux chromosomes X dans les cellules des mammifères femelles permet aux cellules femelles d'exprimer un unique allèle des gènes présents sur le chromosome sexuel, les mettant ainsi à égalité avec les cellules mâles (Kalantry, 2011).

Elle présente globalement les mêmes caractéristiques structurales (état compacté) et moléculaires (hypo-acétylation et hyper-méthylation des histones, méthylation de l'ADN) que l'hétérochromatine constitutive. Par ailleurs, cette structure impose un « silencing » qui joue un rôle clé dans la régulation de gènes importants pour la différenciation cellulaire et le développement des organismes pluricellulaires (Trojer and Reinberg, 2007).

1.2.3. Mécanisme général de formation de l'hétérochromatine

1.2.3.1. Formation d'hétérochromatine chez les eucaryotes supérieurs

L'hétérochromatine présente la propriété de se propager à partir du site de nucléation, puis de se maintenir une fois en place. La propriété de propagation est illustrée par l'effet PEV (Position Effect Variegation), conduisant à l'inhibition transcriptionnelle de gènes positionnés à proximité d'un site d'hétérochromatine (Fodor et al., 2010). Le site de nucléation peut-être une séquence particulière (« silencer »), un élément répété, ou un ARN

(Grewal and Moazed, 2003). Une fois recrutée à cet élément par la marque H3K9me, les protéines HP1 joueraient alors un rôle central dans la propagation de l'hétérochromatine. Ces protéines présentent en plus de leur chromodomaine dans la partie N-terminale, un domaine chromoshadow du côté C-terminal (Figure 11). Ce dernier est capable d'interagir avec de nombreux partenaires (Lechner et al., 2005), et notamment des histones déacétylases (HDAC), et des histones méthyl-transférases (HMT) pour mettre en place les marques typiques de l'hétérochromatine. Ainsi, l'HMT catalysant la méthylation d'H3K9 (Su(var)3-9 chez les drosophiles, SUV39H1 chez les mammifères, ou Clr4 (Cryptic loci regulator 4) chez *S. pombe*; Rea et al., 2000) serait recrutée directement par HP1, permettant ainsi l'association de nouvelles enzymes nécessaires à la formation d'hétérochromatine ainsi que de nouvelles protéines HP1 aux nucléosomes adjacents, et finalement la propagation de ces marques (Aagaard et al., 1999 ; Haldar et al., 2011). HP1 présente également la capacité de former un tétramère, favorisant ainsi la propagation de HP1 de nucléosome en nucléosome (Canzio et al., 2011).

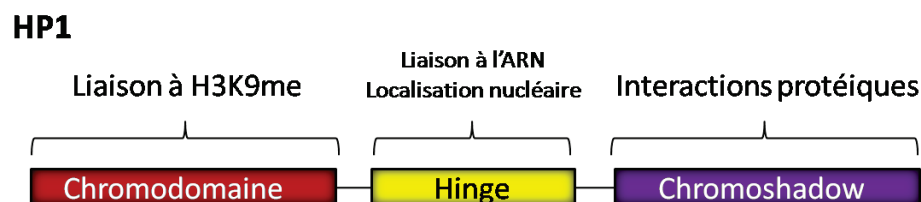


Figure 11. Structure générale des protéines HP1. Le chromodomaine permet la reconnaissance de la marque H3K9me²⁻³. Le domaine chromoshadow est impliqué dans la tétramérisation de HP1 et l'interaction avec de nombreux partenaires protéiques. Le domaine Hinge est la partie la moins conservée entre les espèces. Elle contient un signal de localisation nucléaire, et elle permettrait également l'interaction avec des ARN (Zeng et al., 2010).

Chez les mammifères, la marque H3K27me est mise en place par le complexe Polycomb PRC2, ce qui induit le recrutement de nouveaux complexes PRC2 pour propager cette marque aux autres nucléosomes, ainsi que de PRC1 (Beisel and Paro, 2011). La méthylation de l'ADN est mise en place *de novo* par les DNMT 3A et 3B et maintenue par la DNMT1 chez les mammifères (He et al., 2011). Enfin des ARNnc peuvent jouer un rôle important dans la formation de l'hétérochromatine. Ces ARNnc peuvent être de petite taille (20 à 32nts), les mécanismes de formation de l'hétérochromatine impliquant ces petits ARN sont décrits dans le chapitre II. Des ARNnc de grande taille sont aussi impliqués dans la formation de l'hétérochromatine, notamment au niveau des gènes soumis à l'empreinte et

du chromosome X inactif. Par exemple, l'ARNnc Xist d'une taille de 17kb est exprimé par le chromosome X inactif et le recouvre complètement. Cet ARN serait essentiel pour la mise en place du « silencing » de l'ensemble du chromosome en permettant notamment le recrutement de PRC2 qui met alors en place la méthylation H3K27, et la méthylation de l'ADN par DNMT3A. Un mécanisme similaire serait utilisé pour la mise en place de H3K27me et de la méthylation de l'ADN au niveau des gènes soumis à l'empreinte, impliquant entre autres des transcrits antisens de ces gènes, PRC2 et DNMT3A (Beisel and Paro, 2011).

Une fois initiée, l'hétérochromatine se propage jusqu'à des éléments frontières. Ces éléments sont généralement des sites de recrutement de facteurs spécifiques bloquant la propagation de l'hétérochromatine. Chez *S. pombe* par exemple, le facteur de transcription TFIIIC (Transcription Factor III Complex), une sous-unité de la polymérase III, s'associe de manière spécifique à une séquence (B Box) présente dans les domaines IR à la frontière de l'hétérochromatine de la région du déterminisme sexuel (Grewal and Jia, 2007).

1.2.3.2. Formation d'hétérochromatine chez *S. pombe*

Chez *S. pombe*, la nucléation, la propagation et la maintenance de la structure hétérochromatique implique les trois classes d'HDAC, l'HMT Clr4 (Cryptic loci regulator 4), et les protéines à chromodomaine Swi6 et Chp1 et Chp2 (Sadaie et al., 2004 ; Sadaie et al., 2008 ; Canzio et al., 2011).

Différentes HDAC ont été identifiées comme impliquées dans la déacétylation des histones H3 et H4, un pré-requis pour la formation de l'hétérochromatine: Sir2, qui induit la déacétylation de H3K9, H3K56 et H4K16 (Shankaranarayana et al., 2003 ; Xu et al., 2007), Clr6, importante pour la déacétylation globale de H3 et H4 (Bjerling et al., 2002 ; Kim et al., 2004), et Clr3 impliquée dans la déacétylation de H3K14 (Yamada et al., 2005 ; Motamedi et al., 2008).

L'HMT Clr4 joue un rôle essentiel dans la mise en place, la propagation et la maintenance de toutes les régions d'hétérochromatine constitutive (Zhang et al., 2008). Elle contient une activité catalytique SET (Su(var)3-9 Enhancer of zeste, Trithorax) en C-ter, lui conférant son activité d'HMT spécialisée dans la méthylation de H3K9 (Rea et al., 2000). Clr4

est recrutée et agit sur la chromatine au sein du complexe CLRC (Clr4-Rik1-Cul4; Hong et al., 2005). CLRC est constitué de différentes sous-unités, dont Clr4, et quatre protéines associées à une activité de type E3 ubiquitine-ligase, et impliquées elles aussi dans la formation d'hétérochromatine, Rik1, Cul4, Raf1 et Raf2, suggérant l'implication d'un processus de dégradation protéique pour la mise en place de l'hétérochromatine (Hong et al., 2005 ; Horn et al., 2005 ; Zhang et al., 2008). Le chromodomaine de Clr4, en permettant l'association de CLRC avec la marque H3K9me, jouerait un rôle important dans la propagation de cette marque (Zhang et al., 2008). Par ailleurs, la mise en place de cette marque permet alors le recrutement stable de Swi6 médié par son chromodomaine (Ekwall et al., 1996 ; Bannister et al., 2001). L'interaction physique entre Clr4 et Swi6 favoriserait la propagation de l'hétérochromatine (Haldar et al., 2011).

La protéine Swi6 est essentielle à la mise en place d'une structure compacte répressive, grâce à sa propriété d'auto-assemblage (Sadaie et al., 2008 ; Canzio et al., 2011). Elle favorise également le recrutement de différentes protéines impliquées dans la mise en place du « silencing » transcriptionnel, en plus de Clr4 (voir le chapitre II). La protéine Chp2 induit elle aussi le recrutement de différents acteurs impliqués dans le « silencing » transcriptionnel tel que l'HDAC Clr3 (Sadaie et al., 2008 ; Motamedi et al., 2008). Les mécanismes de la mise en place de ce « silencing » sont détaillés dans le chapitre II (paragraphe 4). La protéine Chp1 joue un rôle fondamental dans la mise en place de toutes les régions d'hétérochromatine constitutive. Elle est également impliquée dans la maintenance de l'hétérochromatine péri-centromérique, son absence induisant une perte importante de H3K9me et de Swi6 et Chp2 au niveau de ces régions (Sadaie et al., 2004).

L'initiation du recrutement de ces différentes protéines effectrices implique différents mécanismes de nucléation de l'hétérochromatine, pouvant fonctionner de manière redondante. Cet élément de nucléation peut être une séquence d'ADN reconnue spécifiquement par une protéine de liaison à l'ADN, ou un ARN double brin induisant l'activation de la voie cellulaire de l'interférence à l'ARN (ou RNAi).

Les protéines de liaison à des motifs spécifiques de l'ADN, tels que des facteurs de transcription, peuvent être impliquées dans l'initiation de la formation de l'hétérochromatine. Les facteurs de transcription à « leucine zipper » Atf1 et Prc1, de la famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/cAMP Response Element Binding) sont les

plus connus. Le domaine « leucine zipper » de ces facteurs de transcription reconnaît spécifiquement une séquence heptamérique CRE (cAMP Response Element), et deux de ces séquences sont retrouvées au milieu du locus hétérochromatique du déterminisme sexuel. Une fois associés à ces sites, l'hétérodimère Atf1/Pcr1 coopérerait avec l'HDAC Clr3 (Yamada et al., 2005), et induirait le recrutement de l'HDAC Clr6, de l'HMT Clr4 et de Swi6 pour initier la formation de l'hétérochromatine (Jia et al., 2004 ; Kim et al., 2004). Un mécanisme similaire a été identifié au niveau des péricentromères pour lesquels les protéines Abp1 et Cbh1 (des homologues de Cenp-B, Centromere protein B) s'associeraient spécifiquement à l'ADN centromérique. Leur recrutement à la chromatine induirait la déacétylation de H3K9 et K14, puis la méthylation de H3K9, et le recrutement de Swi6 (Nakagawa et al., 2002). Enfin, au niveau des subtélomères, c'est la protéine Taz1 ciblant directement les séquences répétées des télomères qui jouerait un rôle dans la mise en place de H3K9me et de la protéine Swi6 (Kano et al., 2005). La sous-unité Rad21 (Radiation protein 21) du complexe des cohésines joue aussi un rôle important pour la présence de H3K9me et de Swi6 aux subtélomères (Dheur et al., 2011).

Chez *S. pombe*, les mécanismes de l'interférence à l'ARN (RNAi) jouent également un rôle important dans la mise en place de l'hétérochromatine constitutive. Le RNAi est un mécanisme conservé au cours de l'évolution des eucaryotes, impliqué dans la régulation de nombreux processus essentiels (détaillé dans le chapitre suivant). Les mécanismes du RNAi sont impliqués directement dans l'établissement *de novo* de toutes les régions d'hétérochromatine constitutive chez *S. pombe* (Hall et al., 2002). Par ailleurs, ils sont strictement requis pour le maintien de cette structure au niveau des péricentromères (Volpe et al., 2002). En revanche, ils agissent de manière redondante avec les mécanismes médiés par les protéines de liaison à l'ADN présentés ci-dessus pour le maintien de cette structure aux subtélomères (Hansen et al., 2006), et à la région *mat* (Jia et al., 2004 ; Petrie et al., 2005). Le RNAi cible principalement les séquences répétées de type *dg* et *dh* des péricentromères, ainsi que les régions homologues aux séquences *dh* des subtélomères et *cenH* de la région *mat* (Cam et al., 2005), et procède à la mise en place du « silencing » de ces régions et des différentes marques hétérochromatiques (Volpe et al., 2002 ; Hall et al., 2002). Les mécanismes mis en jeu sont détaillés dans le chapitre suivant.

En conclusion, l'hétérochromatine joue un rôle central dans le maintien de la stabilité du génome, l'organisation et la fonction des centromères et des télomères, et la régulation des processus fondamentaux que sont la différenciation cellulaire et le développement. Les mécanismes impliqués dans la formation de cette structure ne sont pas encore tous élucidés, et l'utilisation de modèles d'étude simplifiés tel que *S. pombe* permet d'améliorer les connaissances.

Chapitre II

L'interférence à l'ARN

2.1. Le RNAi : généralités

L'interférence à l'ARN est un mécanisme cellulaire dépendant de l'ARN, qui permet d'inhiber l'expression de gènes avec une grande spécificité de séquence. Ce mécanisme implique des petits ARN non codants d'une taille allant de 20 à 32nts de long, les ARN interférants, associés à une protéine de la famille des Argonautes. Ensemble, ils servent de guides à différents complexes régulateurs pour reconnaître l'ARN de séquence complémentaire. Cette interaction conduit à l'inactivation spécifique de cet ARN (pour revue : Ketting, 2011).

Les mécanismes du RNAi ont été mis en évidence chez la plupart des eucaryotes étudiés, avec l'exception de *S. cerevisiae*. Il est cependant à noter que d'autres espèces de levures à bourgeonnement telle que *Saccharomyces castellii* présentent un RNAi fonctionnel qui ciblerait essentiellement les ARN issus d'éléments transposables pour les inhiber. L'introduction des gènes codants pour les protéines Dicer et Argonaute de *S. castellii* dans le génome de *S. cerevisiae* permet de restaurer la voie du RNAi, qui cible alors les retrotransposons endogènes (Drinnenberg et al., 2009). De nombreux éléments indiquent que des processus apparentés au RNAi existent chez les bactéries et les *Archaea* bactéries (Carmell and Hannon, 2004 ; Marraffini and Sontheimer, 2010). Ces éléments de conservation seront brièvement présentés dans ce chapitre.

Les principaux petits ARN produits dans les cellules somatiques eucaryotes sont de type ARN micro (miARN) et ARN « small interfering » (siARN), et se différencient essentiellement par leur origine et leur mode d'action (Carthew and Sontheimer, 2009). Dans les cellules germinales métazoaires, les ARN piwi (piARN ; Piwi : P-element induced wimpy testis) sont majoritaires (Siomi et al., 2011).

Le RNAi joue un rôle dans des processus aussi fondamentaux que la régulation de la division et de la différenciation cellulaire, l'apoptose, et la défense de la cellule contre l'intrusion de virus. Chez les mammifères, plus de 30% des gènes seraient sujets à une régulation par les miRNA. De ce fait, de nombreuses voies cellulaires sont affectées par leur régulation, la majeure partie de ces voies contrôlant la différenciation et la prolifération cellulaire (Hime and Somers, 2009). Ils jouent également un rôle très important dans l'apparition et le développement des cancers, comme suppresseurs de tumeur ou comme oncogènes (Garzon et al., 2009). Le rôle biologique des siARN endogènes est moins bien défini. Ils seraient plutôt impliqués dans la défense du génome contre les virus, principalement chez les plantes, ou contre les éléments transposables des cellules somatiques, mais ils pourraient également être importants pour la régulation de l'expression de gènes codants (Okamura and Lai, 2008 ; Saito and Siomi, 2010). La fonction principale des piARN est de maintenir les éléments transposables dans un état inactif de « silencing » dans les cellules germinales. Les piARN jouent un rôle essentiel dans le développement des cellules germinales : une altération de ces mécanismes conduit à une diminution de la fertilité (Klattenhoff and Theurkauf, 2008).

De nombreux travaux s'intéressent maintenant aux dérégulations des processus cellulaires liés aux petits ARN, et cherchent à comprendre leur fonctionnement, ainsi qu'à les utiliser comme cibles thérapeutiques (Castanotto and Rossi, 2009).

2.2. Mécanisme général

Le RNAi peut agir à deux niveaux selon la localisation de la cible, dans le cytoplasme ou le noyau. Au sein du cytoplasme, l'action du RNAi vise les ARNm matures après exportation du noyau. A l'opposé, dans le noyau, le RNAi agit directement sur la chromatine en s'associant avec un ARN en cours de polymérisation. Ces deux niveaux de régulation mettent en jeu des mécanismes qui reposent sur le même schéma : une fois activé (phase activatrice), le RNAi fait intervenir ses complexes effecteurs, qui par un mécanisme de reconnaissance ARN-dépendant agissent très spécifiquement sur l'ARN cible (phase effectrice ; Figure 12).

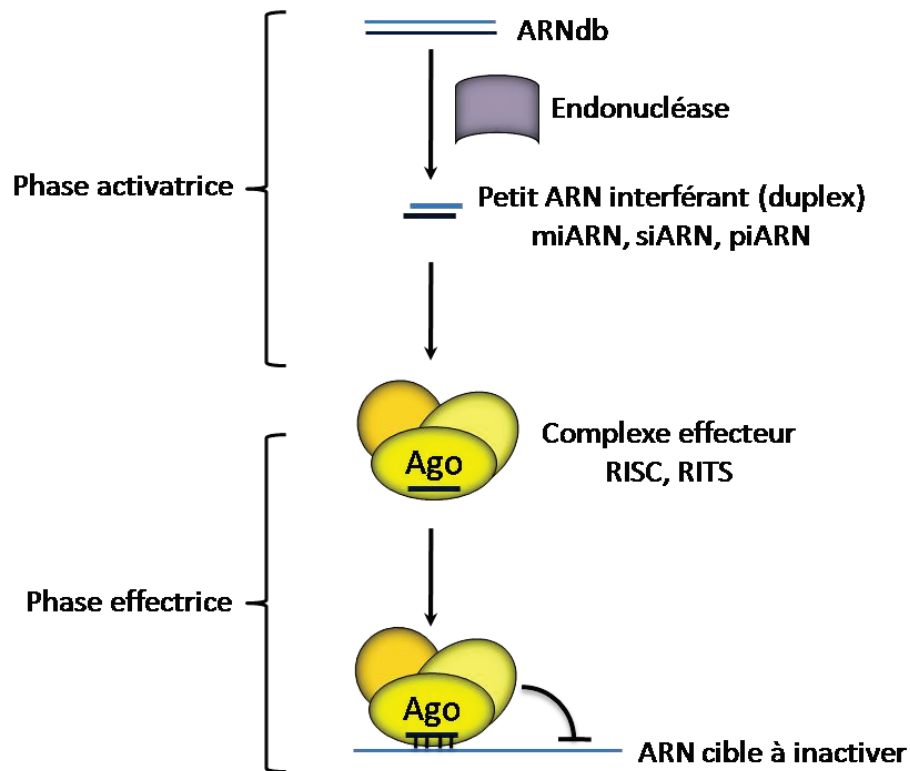


Figure 12. Mécanisme général du RNAi : la phase activatrice et la phase effectrice. Le RNAi est activé en règle générale par la présence d'ARN double brin, qui est alors clivé par une endonucléase pour former les petits ARN interférants. Dans la phase effectrice, ces derniers sont pris en charge par la protéine Argonaute (Ago) au sein de complexes effecteurs pour inactiver l'ARN cible.

2.2.1. La phase activatrice

Les petits ARN interférants sont générés et chargés dans les protéines Argonautes au cours de la phase activatrice (Figure 12). Dans la plupart des cas, ils sont issus du clivage d'un ARN double brin (ARNdb) de longue taille effectué par des ribonucléases dans les cellules somatiques, mais ils peuvent aussi être issus d'ARN simples brins (ARNsb) comme dans les cellules germinales.

2.2.1.1. Biogenèse de petits ARN interférants par des ribonucléases

Dans les cellules somatiques, le RNAi est activé par la présence dans la cellule d'ARNdb exogènes ou endogènes. Les ARNdb exogènes proviennent généralement de virus, ils conduisent à la production de siARN exogènes. Les ARNdb endogènes donnent lieu à la

production de siARN endogènes (endo-siARN), ou de miARN. Il existe différentes sources d'ARNdb endogènes.

i) Les ARN doubles brins endogènes

Ils peuvent être constitués d'une seule molécule d'ARN capable de se replier pour former des structures intramoléculaires dites en épingle à cheveu, selon le principe d'appariement des bases homologues. Ces ARN en épingle à cheveu constituent les précurseurs des miARN chez les plantes et les métazoaires (Fabian et al., 2010), et de certains endo-siARN identifiés chez les drosophiles et les souris (Okamura and Lai, 2008 ; Figure 14).

Dans certains cas, les ARNdb peuvent être constitués de l'appariement de deux molécules d'ARN chacune issue de la transcription bidirectionnelle d'un locus unique, ou issue de la transcription de deux loci différents. Ces ARN permettent également la production des endo-siARN des drosophiles et des souris (Okamura and Lai, 2008 ; Figure 14).

Chez les plantes, *C. elegans* et *S. pombe*, la production des siARN endogènes nécessite une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP, RNA-dependant RNA Polymerase), dont l'activité permet de synthétiser un ARN complémentaire à un ARN simple brin, créant ainsi un ARNdb (Sijen et al., 2001 ; Sugiyama et al., 2005). Les siARN produits par RdRP sont considérés comme des siARN secondaires. En effet, une production initiale modérée d'endo-siARN par l'intermédiaire d'ARNdb endogènes directement issus de la transcription serait nécessaire pour l'activation des RdRP (Djupedal et al., 2009).

L'ARNdb activateur est reconnu et clivé par des ribonucléases de type III, générant ainsi les petits ARN interférants.

ii) Les ribonucléases

Les ribonucléases III (RNase III) sont des endonucléases spécifiques des ARNdb. Elles produisent des petits ARNdb de 20 à 70nts caractérisés par deux nucléotides non appariés en 3'. Elles contiennent deux domaines fonctionnels essentiels: un domaine de liaison aux ARNdb (DARNdb), et un domaine à activité catalytique d'endonucléase (RNase III ; Figure 13).

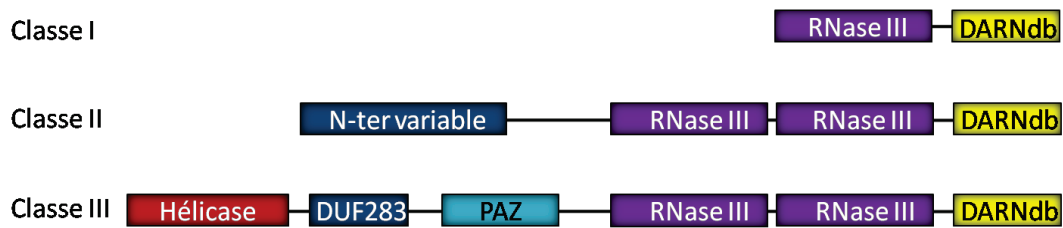


Figure 13. Les différentes classes de ribonucléases de type III (RNase III). Représentation schématique de la structure des domaines des RNases III des trois classes connues. Classe I : Exemple de la RNase III d'*E. coli*. Classe II : Drosha. Classe III : Dicer. DARNdb = Domaine de liaison à l'ARN double brin. RNase III = activité ribonucléase de type III. PAZ = Piwi-Argonaute-Zwille. DUF = Domain of Unknown Function. N-ter = Partie N-terminale.

Les RNases III ont été classées en trois catégories selon l'organisation de leurs domaines fonctionnels (Figure 13 ; Carmell and Hannon, 2004). Les RNases III de classe I sont les plus simples (Figure 13). Elles ont été identifiées chez la bactérie *Escherichia coli*, chez laquelle elles sont impliquées dans la maturation de différents types d'ARN, et dans l'induction de la dégradation d'ARN messagers (Nicholson, 1999).

Les RNases III de classe II sont connues sous le nom de Drosha. Elles contiennent deux domaines RNase III, et une région N-terminale variable impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines (Figure 13). Elles jouent un rôle important lors des étapes initiales de la maturation des miARN dans le noyau des cellules (Figure 14). Elles ont été identifiées chez *C. elegans* et *D. melanogaster* (Filippov et al., 2000) et sont conservées chez la souris et l'humain (Lee et al., 2003).

La dernière classe de RNase III regroupe toutes les protéines de types Dicer. Ces enzymes de haut poids moléculaire (200 kDa en moyenne) contiennent des domaines fonctionnels supplémentaires. En plus du domaine de reconnaissance des ARNdb et de deux domaines RNase III en partie C-terminale, elles présentent un domaine à activité d'hélicase à ARN, un domaine DUF283 (Domain of Unknown Function) de fonction inconnue, et un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) (Figure 13). De nombreuses études réalisées essentiellement sur des RNases III bactériennes ou d'*Archaea* bactéries ont permis de caractériser la structure cristallographique de ces différents domaines associés à l'ARN, apportant ainsi des indications précieuses sur le mode de reconnaissance de ce dernier (Nowotny and Yang, 2009). Ainsi, il a été montré que le domaine PAZ forme une poche

permettant la liaison avec l'extrémité 3' du petit ARN. Il contient environ 130 acides aminés et se lie spécifiquement aux nucléotides non appariés de l'extrémité 3' des ARNdb en épingle à cheveu (Nowotny and Yang, 2009). Les enzymes Dicer sont généralement cytoplasmiques et jouent un rôle essentiel dans la production des siARN et des endo-siARN, et dans les étapes de maturation finales des miARN. Elles produisent des petits ARNdb de 20 à 30nts avec deux nucléotides non appariés aux deux extrémités 3' (Figure 14). Ces RNases III de classe III ont été initialement identifiées chez la drosophile et ses homologues sont retrouvés chez les plantes, les mammifères, *C. elegans*, et *S. pombe* (Bernstein et al., 2001).

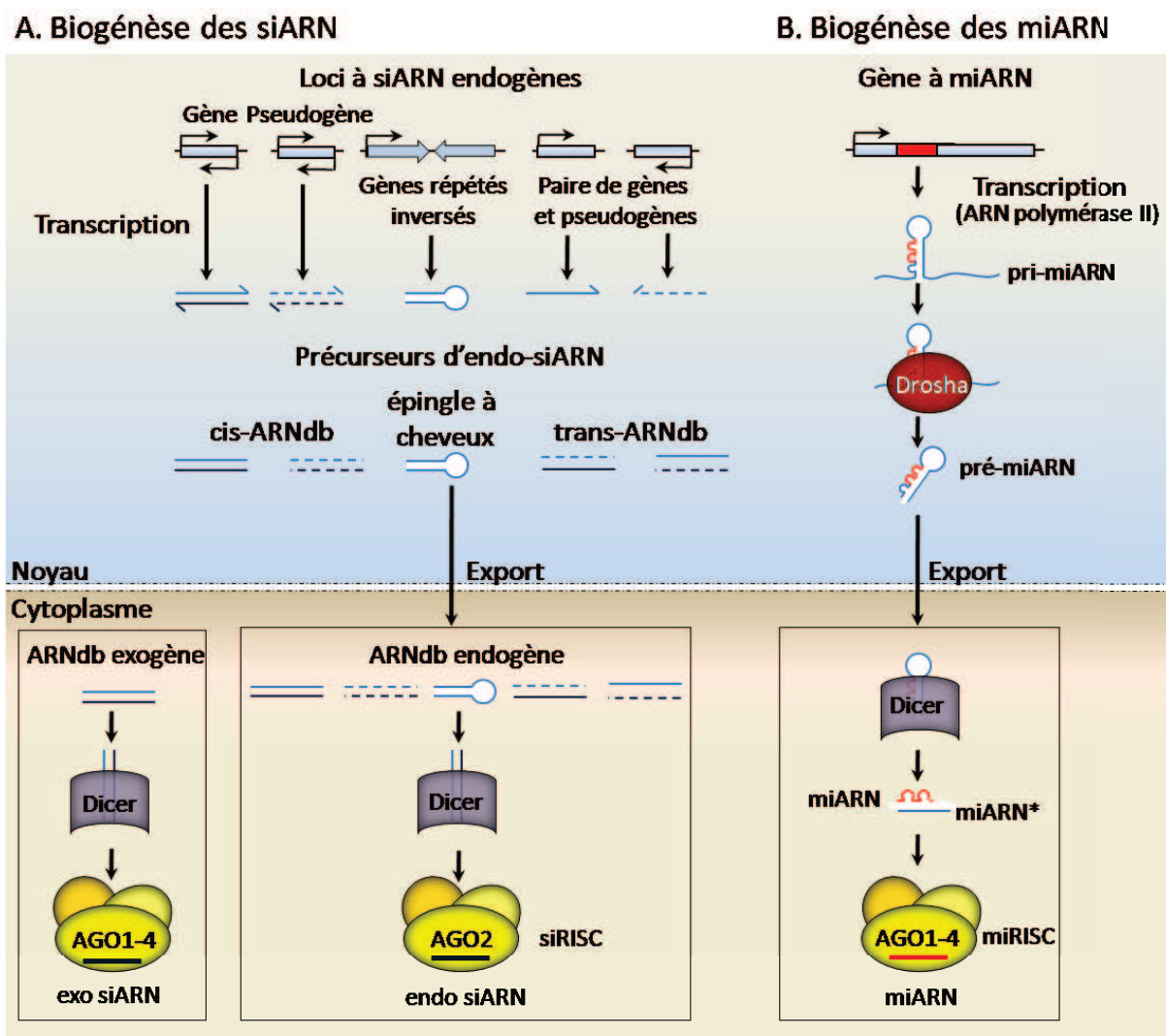


Figure 14. Biogénèse des siARN et des miARN chez les mammifères. A. Biogénèse des siARN. Site de production de siARN endogènes: De gauche à droite : Des ARN doubles brins (ARNdb) sont issus de la transcription bidirectionnelle d'un locus de gène codant (flèches bleues pleines), d'un locus de pseudogène (flèches bleues en pointillés), ou de régions intergéniques répétées inversées tels que des transposons (épingle à cheveu). Ces ARNdb sont exportés du noyau, et sont clivés par Dicer. Les

endo-siARN matures de 21nts de long sont pris en charge par Argonaute 2 (Ago2) au sein des complexes siRISC. Les ARNdb exogènes sont clivés par Dicer de la même façon que les ARNdb endogènes. Ils sont ensuite pris en charge par différentes Argonautes. **B. Biogénèse des miARN.** La transcription d'un locus miARN par l'ARN polymérase II conduit à la formation d'un long ARN avec une structure secondaire en épingle à cheveu, le pri-miARN. Celui-ci est clivé une première fois dans le noyau par Drosha pour donner un précurseur de miARN (pre-miARN) de 60 à 70nts en moyenne. Après exportation du noyau les pre-miARN subissent une nouvelle étape de clivage, par Dicer, qui produit de petits ARNdb de 22nts environ. Le brin passager miARN* est éliminé, et le miARN mature est pris en charge par Ago1 ; 2 ; 3 ou 4, au sein des complexes miRISC. Voir le texte pour plus de détails.

2.2.1.2. Génération de petits ARN interférants indépendants des RNases III

Certains endo-siARN de cellules somatiques sont générés de manière indépendante des RNase III. C'est le cas d'une sous-population de siARN produits directement par RdRP chez *C. elegans*, les siARN 22G (22nts de long, et une guanine à l'extrémité 5'), essentiels à la régulation de l'expression de gènes et à la fonction des centromères dans la ségrégation des chromosomes (Ketting, 2011).

La production de toute une classe de petits ARN interférants serait également totalement indépendante des RNase III : la classe des piARN. Cette classe de petits ARN interférants a été identifiée uniquement chez les métazoaires à ce jour, et serait présente majoritairement dans les cellules germinales, pour réduire l'expression des transposons au silence (Siomi et al., 2011). Ils sont synthétisés selon deux mécanismes principaux, distingués par la manière de générer leur extrémité 5'.

Les ARN précurseurs des piARN seraient initialement synthétisés à partir de loci de 50 à plus de 200kb répartis sur l'ensemble du génome et comportant des fragments de séquences issues de transposons (Brennecke et al., 2007). Chacun de ces loci serait entièrement transcrit en une longue molécule d'ARN simple brin, qui est ensuite exportée vers le cytoplasme (Figure 15). Le clivage de cet ARN simple brin est catalysé par une endonucléase encore inconnue. Cependant des travaux récents effectués chez la drosophile révèlent l'implication de nouvelles enzymes, présentant des activités potentielles d'hélicase à ARN, ou de nucléase (Olivieri et al., 2010). Ce clivage conduit à la synthèse de piARN primaires caractérisés par la présence d'une uracile à leur extrémité 5' (Ketting, 2011).

Un mécanisme de synthèse secondaire est initié, toujours dans le cytoplasme, suite à la production des piARN primaires. Il dépend du clivage des ARN ciblés par les piARN primaires (majoritairement des ARN de transposons) et les protéines Argonautes de la classe des PIWI, et conduirait à la production de piARN caractérisés par une adénine en position 10 (dans le sens 5'-3'). Ce modèle « ping-pong » suggère que ce clivage pourrait mettre en jeu l'activité de clivage endonucléase de type « slicer » des protéines PIWI (Figure 15 ; Brennecke et al., 2007). Ce mécanisme est essentiel pour l'amplification des piARN, et concernerait essentiellement les piARN dérivés de transposons (Brennecke et al., 2007 ; Gunawardane et al., 2007 ; Siomi et al., 2011).

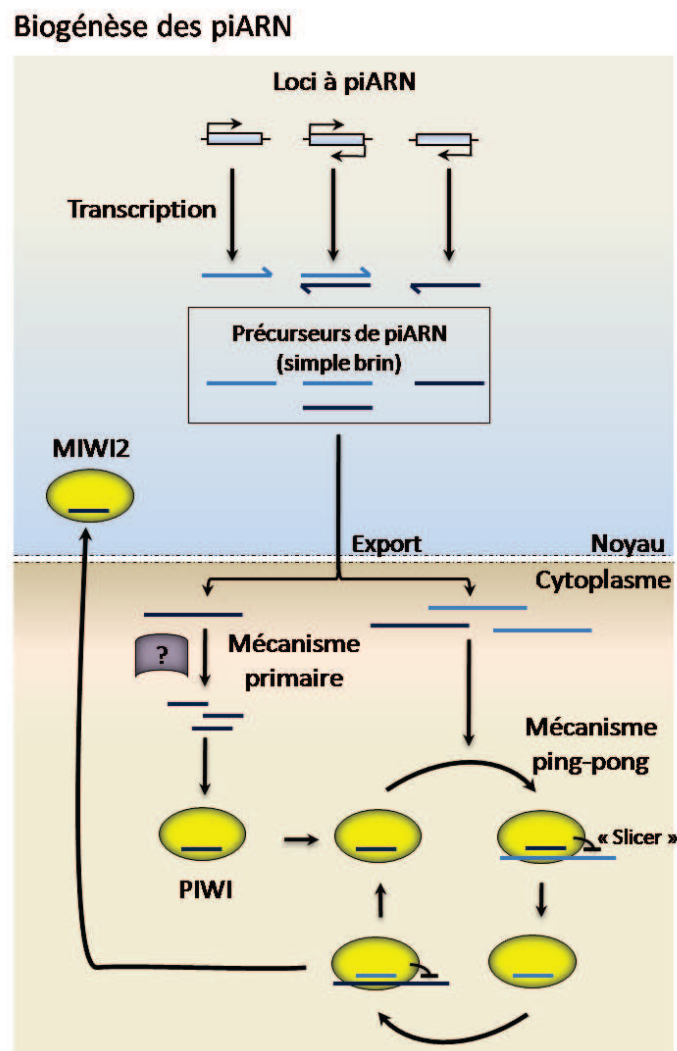


Figure 15. Biogénèse des piARN chez les mammifères. Les piARN (taille moyenne 24 à 32nts) sont issus de longs ARN simples brins transcrits à partir de loci intergéniques concentrés en séquences à piARN. Dans le mécanisme primaire, les ARN précurseurs des piARN ne sont pas clivés par Dicer, mais par une nucléase non connue. Ces piARN initiaux sont amplifiés selon un mécanisme de « ping-

pong » impliquant l'activité « slicer » des PIWI. La protéine MIWI2 associée à un piARN peut intégrer le noyau. Un mécanisme similaire est mis en œuvre chez les drosophiles.

Bien que tous ces petits ARN interférants soient synthétisés selon différents mécanismes (Figures 14 et 15), ils sont finalement tous pris en charge par une protéine Argonaute, permettant ainsi la mise en place de la phase effectrice du RNAi.

2.2.2. La phase effectrice dans le cytoplasme

La phase effectrice du RNAi conduit au « silencing » des gènes cibles de manière hautement spécifique. Cette très grande spécificité de la phase effectrice et son potentiel à être « programmée » pour identifier un nombre illimité de cibles différentes découlent du mode de reconnaissance original de celles-ci. Le petit ARN interférant constitue l'élément central du mode de reconnaissance de la cible qui repose sur un appariement de séquence entre ce petit ARN et l'ARN cible.

Les protéines Argonautes sont des protéines spécialisées dans la liaison à des petits ARN. Ce sont elles qui prennent en charge le petit ARN produit par la phase d'activation. Elles sont divisées en deux classes en fonction de leur séquence protéique, la classe des protéines Argonautes (Ago) et celle des PIWI. Ces protéines et leur ARN interférant s'associent à d'autres acteurs du RNAi au sein de complexes effecteurs, afin d'induire le « silencing » des gènes cibles en agissant à différents niveaux de régulation post-transcriptionnelle, essentiellement dans le cytoplasme. Ils peuvent dans certains cas agir dans le noyau, et mettre en place un « silencing » transcriptionnel.

2.2.2.1. Mécanismes effecteurs dans le cytoplasme par les protéines Argonautes

i) Les protéines Argonautes

La classe des protéines Argonautes, homologues à Ago1 d'*A. thaliana*, la première Ago identifiée (Bohmert et al., 1998) est conservée chez la plupart des eucaryotes. On retrouve parmi les membres de cette classe, les Ago humaines Ago1 ; 2 ; 3 et 4, spécifiques des siARN et des miARN (Figure 14), ou Ago1 chez *S. pombe*. Des protéines Ago ont

également été identifiées chez certaines bactéries (Yuan et al., 2005 ; Makarova et al., 2009) et chez des *Archaea* bactéries (Li et al., 2010), cependant leur fonction n'est pas encore bien caractérisée.

Ce sont des protéines d'un poids moléculaire moyen de 100kDa caractérisées par la présence de trois domaines fonctionnels indispensables. Deux domaines permettent l'interaction avec l'ARN interférant en formant des poches, le domaine PAZ similaire à celui des Dicer interagissant avec l'extrémité 3', et le domaine MID (middle) lié à la partie 5'. (Figure 16 ; Nowotny and Yang, 2009 ; Jinek and Doudna, 2009). Le domaine PIWI en C-ter présente des similitudes avec les enzymes ribonucléase H (RNaseH). Ce domaine contient une activité enzymatique appelée « slicer », conférant aux Argonautes la capacité de cliver l'ARN cible apparié au siARN. Cette activité n'est avérée que chez certaines Ago, comme Ago2 chez l'humain, ou Ago1 chez *S. pombe* (Liu et al., 2004a ; Irvine et al., 2006).

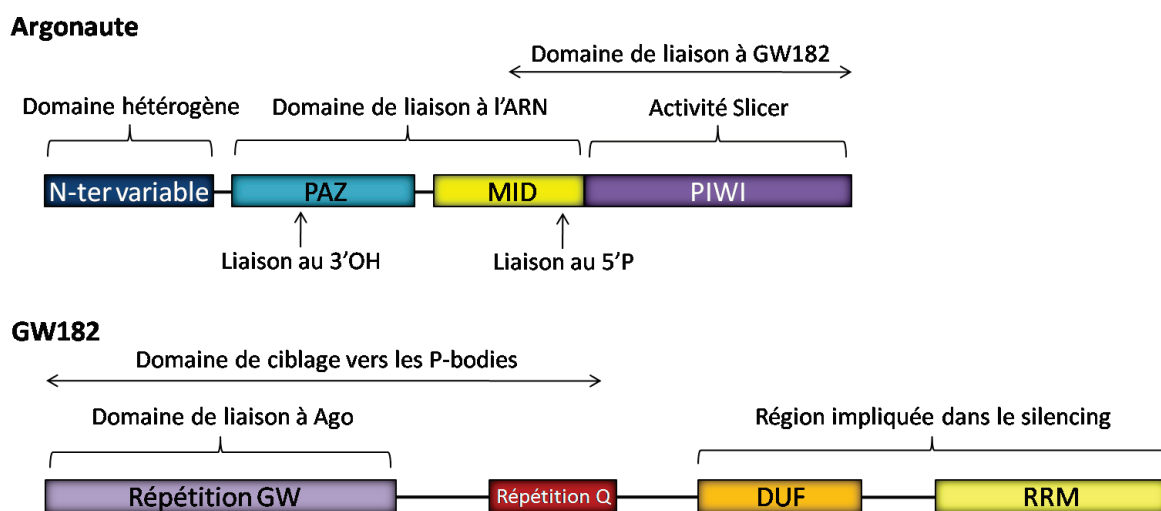


Figure 16. Structure des protéines Argonautes et GW182. 3'OH / 5'P = Extrémité 3'OH / Extrémité 5'Phosphate du petit ARN associé à Argonaute. Répétition GW = domaine riche en motif Glycine-Tryptophane. Répétition Q = région riche en glutamine. RRM = RNA Recognition Motif. Voir le texte pour les détails.

ii) Le complexe RISC

Dans le cytoplasme, les complexes ribonucléoprotéiques contenant la protéine Ago liée à son ARN interférant sont appelés RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Au sein de ces complexes, la protéine Ago s'associe à différents co-facteurs lui permettant d'induire le « silencing » de l'ARN cible selon différents mécanismes (Figure 12).

L'assemblage du complexe RISC requiert deux étapes. Au cours de la première étape, la protéine Ago du complexe RISC prend en charge le petit ARN double brin issu de la voie de biogénèse des mi ou des siARN. Dans la deuxième étape, un des deux brins du petit ARN, appelé le brin passager, est éliminé de manière dépendante ou indépendante de l'activité « slicer » de Ago (Kawamata and Tomari, 2010).

Le complexe RISC mature est guidé vers l'ARN cible par le siARN (siRISC) ou le miARN (miRISC) qu'il contient (Figure 12). Il induit alors la dégradation de cet ARN, ou l'inhibition de sa traduction selon le degré de complémentarité entre le petit ARN et l'ARN cible. Une complémentarité parfaite favoriserait la dégradation, alors que des défauts de complémentarité conduiraient à une inhibition au niveau traductionnel (Fabian et al., 2010).

iii) Mécanismes du « silencing » par les complexes miRISC

Un grand nombre de travaux a permis d'établir un modèle en ce qui concerne les mécanismes impliqués dans la dégradation de l'ARNm ciblé par miRISC. Selon ce modèle, l'ARN ciblé par RISC subit une dégradation de sa queue 3' de poly-adénine (polyA) dans le sens 3'-5' catalysée par des exoribonucléases, suivie d'une dégradation de la coiffe 5' protectrice (Figure 17). La protéine GW182, une sous-unité du complexe RISC jouerait un rôle central dans ce processus. Au sein du complexe RISC, les protéines GW182 interagissent directement avec les protéines Ago par l'intermédiaire d'un domaine riche en motifs GW (Glycine-Tryptophane) dans leur partie N-ter (Figure 16). Cette interaction est indispensable à l'établissement du « silencing » par les miARN (Eulalio et al., 2008).

La déadénylation de l'ARN cible implique CCR4-NOT1 (Eulalio et al., 2008 ; Fabian et al., 2009 ; Piao et al., 2010), un complexe déadénylase très conservé au cours de l'évolution des eucaryotes, essentiel pour la régulation de l'expression de gènes (Collart and Timmers, 2004). Il a été montré que certaines protéines Ago interagissent avec la sous-unité CAF1 du complexe CCR4-NOT1, permettant ainsi son recrutement sur l'ARN à dégrader (Fabian et al., 2009 ; Figure 17.1).

La protéine PABP (Poly(A) Binding Protein), se liant spécifiquement à la queue polyA des ARN, est elle aussi essentielle pour l'induction de la déadénylation des ARN cibles (Fabian et al., 2009). L'interaction entre la protéine PABP et la protéine GW182 permettrait de juxtaposer la queue polyA au complexe CCR4-NOT1 pour favoriser sa dégradation (Figure 17 1 ; Fabian et al., 2009 ; Zekri et al., 2009). Ainsi, le complexe RISC servirait de plateforme

de recrutement pour CCR4-NOT1 et PABP, pour induire la déadénylation de l'ARN cible (Figure 17 1).

Le complexe de dégradation de la coiffe DCP1-DCP2 est également impliqué dans la dégradation des ARN cibles de miRISC (Figure 17 2 ; Rehwinkel et al., 2005 ; Behm-Ansmant et al., 2006).

Cet ARN ainsi fortement déstabilisé serait ensuite dégradé par d'autres exonucléases cellulaires.

Ce processus de dégradation pourrait être facilité par un ciblage de l'ARN vers des régions du cytoplasme riches en protéines impliquées dans la maturation ou la dégradation des ARN, les P-bodies (Processing bodies), médié par la partie N-ter des protéines GW182 (comprenant le domaine GW et un domaine riche en glutamines « répétition Q » ; Figure 16 ; Eulalio et al., 2007 ; Fabian et al., 2010).

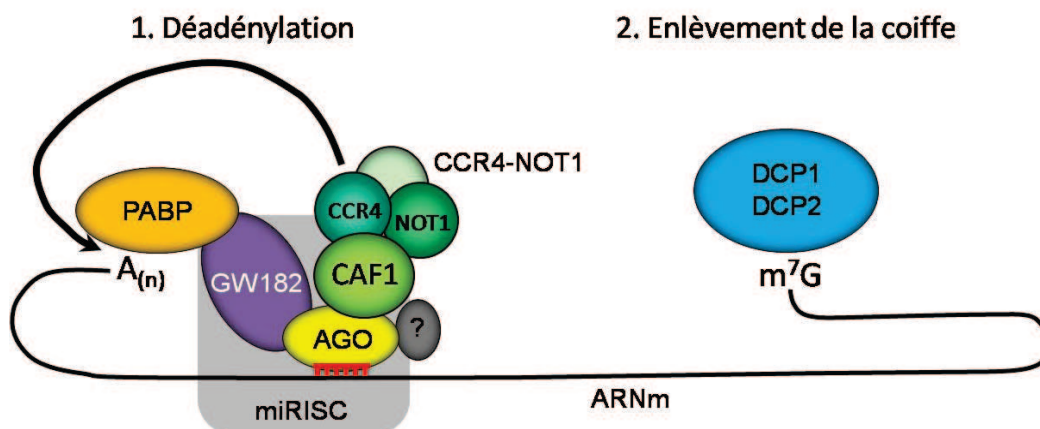


Figure 17. « Silencing » post-transcriptionnel médié par miRISC. m⁷G = Coiffe 5' terminale des ARN messagers. (A)_n = queue de poly-adénine des ARNm. Voir le texte pour plus de détails.

Les mécanismes impliqués par miRISC dans le « silencing » traductionnel sont encore très controversés. Un premier modèle suggère que miRISC empêcherait la circularisation de l'ARN, une étape requise pour l'initiation de la traduction. L'initiation de la traduction pourrait être perturbée par l'inhibition de l'assemblage du complexe d'initiation au niveau de la coiffe (Pillai et al., 2005). Il a également été suggéré que consécutivement à l'initiation de la traduction, RISC induirait la dissociation prématurée de l'ARNm aux ribosomes. miRISC pourrait également provoquer la dégradation de la chaîne polypeptidique en cours de transcription (Pillai et al., 2007 ; Fabian et al., 2010). Les protéines GW182 joueraient un rôle

important dans l'inhibition de la traduction, notamment grâce à une région effectrice comprenant un domaine DUF (Domain of Unknown Function) et un domaine de liaison à l'ARN de type RRM (RNA Recognition Motif ; Figure 16 ; Beilharz et al., 2009 ; Zipprich et al., 2009).

iv) Mécanismes du « silencing » post-transcriptionnel médié par les complexes siRISC

Une complémentarité de séquence parfaite entre le siARN contenu dans le complexe mature siRISC induirait la dégradation de l'ARN cible. Chez les mammifères et *D. melanogaster*, cette dégradation fait appel à l'activité « slicer » du domaine PIWI de la protéine Ago2. Celle-ci induit le clivage du lien phosphodiester entre les nucléotides de l'ARN cible appariés aux nucléotides 10 et 11 du siARN (dans le sens 5' – 3'). Le produit de dégradation présente alors un résidu 5' monophosphate, et un résidu 3' hydroxyle caractéristiques de l'activité « slicer » (Tomari and Zamore, 2005). L'ARN ainsi clivé peut être soumis à une dégradation par les exonucléases cellulaires (Orban and Izaurralde, 2005), ou à une oligo-uridylation conduisant également à sa dégradation par des exonucléases (Shen and Goodman, 2004). Après « slicing », le complexe siRISC est libéré et peut directement cibler un nouvel ARN à dégrader. Des co-facteurs pourraient être requis pour favoriser l'activité « slicer » d'Ago.

2.2.2.2. Mécanisme d'action des protéines PIWI et des piARN

Les protéines PIWI présentent une homologie de séquence avec la protéine PIWI isolée chez les drosophiles (Lin and Spradling, 1997). Elles ne seraient présentes que chez les métazoaires, et leur expression est dans la plupart des cas restreinte aux cellules germinales. Parmi les protéines PIWI, on retrouve les protéines MIWI, MILI, Piwi et Aubergine, certaines étant spécifiques à une espèce animale. Les mécanismes mis en jeu pour établir le « silencing » des ARN cibles sont encore mal connus.

Une fois associée au piARN, certaines protéines PIWI comme les Aubergines demeurent dans le cytoplasme afin de promouvoir l'inactivation des ARN cibles. Le mécanisme « ping-pong » pourrait jouer un rôle dans cette inactivation, puisqu'il permet à la fois l'amplification des piARN et le clivage des ARN cibles (Klattenhoff and Theurkauf, 2008 ;

Siomi et al., 2011). Bien que les protéines PIWI présentent une activité de clivage endonucléase de type « slicer », son importance dans le « silencing » n'a pas été démontrée.

Des protéines PIWI sont également retrouvées dans le noyau, comme MIWI2 dans les cellules germinales chez les mammifères (Figure 15 ; Aravin et al., 2008), ou PIWI chez les drosophiles qui interagit avec HP1 et s'associe aux régions d'hétérochromatine (Brower-Toland et al., 2007 ; Olivieri et al., 2010). Elles induiraient alors la formation d'hétérochromatine au niveau des loci producteurs de piARN, notamment par la mise en place *de novo* de la méthylation de l'ADN (voir le paragraphe suivant).

Des travaux récents effectués sur la drosophile révèlent que les piARN et la protéine Aubergine joueraient un rôle important dans la déstabilisation des ARNm maternels lors du développement précoce de l'embryon. Les mécanismes mis en jeu impliquent une déadénylation des ces ARNm par la déadénylase CCR4, suggérant un mode d'action similaire à celui des miARN chez les mammifères (Rouget et al., 2010).

Outre son action dans le « silencing » des ARN cibles par l'intermédiaire des complexes mi et siRISC dans le cytoplasme, le RNAi peut également induire des modifications épigénétiques, en agissant directement sur la chromatine, à l'instar des piARN dans les cellules germinales (Verdel et al., 2009).

2.3. RNAi et modifications épigénétiques de régions non codantes

Le RNAi peut également induire des modifications épigénétiques de la chromatine. Cette fonction a été mise en évidence pour une partie des eucaryotes, soit dans des cellules en différenciation, soit dans les cellules somatiques différenciées.

2.3.1. RNAi nucléaire dans un contexte de différenciation cellulaire ou de développement

L'élimination de l'ADN orchestrée par le RNAi chez les protozoaires ciliés constitue un exemple extrême impliquant le RNAi nucléaire dans les processus de différenciation cellulaire. Lors du processus de conjugaison permettant la différenciation sexuelle des protozoaires ciliés, l'ADN du noyau du zygote subit un important remaniement provoquant l'élimination d'une grande partie de cet ADN. Cette élimination implique Twi1, une protéine de type PIWI, et des petits ARN de 28nts de long qui seraient produits par Dicer. Ces derniers induisent la méthylation de H3K9 au niveau des séquences à éliminer. La marque H3K9me est reconnue par des protéines à chromodomaine nécessaires à l'élimination. Toutes les séquences ainsi marquées par cette hétérochromatine sont excisées du génome, générant ainsi un nouveau patrimoine génétique (Matzke and Birchler, 2005). Bien que ce processus fasse appel à des marques épigénétiques, ce n'est pas un mécanisme épigénétique, car la séquence de l'ADN est modifiée. A ce jour, ce type de mécanisme semble restreint aux protozoaires ciliés.

Chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa*, le RNAi est impliqué dans la mise en place du « silencing » de l'ADN non apparié après l'association des chromosomes homologues au cours du processus de méiose. De l'ARNdb serait synthétisé par la protéine à activité RdRP Sad1 à partir de l'ARN issu de la transcription de la région non appariée. Le « silencing » post-transcriptionnel de ces régions est alors médié par une protéine apparentée à Argonaute, Sms2. Ce processus serait important pour protéger l'intégrité du génome lors de la méiose (Matzke and Birchler, 2005), et il serait conservé chez *C. elegans*, pour lequel le « silencing » des chromosomes méiotiques non appariés implique la mise en place de la marque H3K9me2 par des composants du RNAi, tels que la protéine RdRP EGO-1, la protéines Argonaute CSR-1, et des siARN, tous essentiels à la fertilité (Maine et al., 2005 ; She et al., 2009 ; van Wolfswinkel et al., 2009).

Lors des étapes précoces du développement embryonnaire des cellules germinales chez la souris, la méthylation *de novo* de l'ADN au niveau des séquences transposables impliquerait la présence dans le noyau de la protéine Miwi2 associée à des piARN. La mise en place de cette marque répressive favoriserait le « silencing » de ces séquences, important pour le maintien de la stabilité du génome (Figure 13 ; Aravin et al., 2008). Par ailleurs

l'établissement des marques épigénétiques de l'hétérochromatine péricentromérique des cellules somatiques lors du développement précoce de l'embryon de souris impliquerait des ARNnc (Santenard et al., 2010 ; Probst et al., 2010).

L'inactivation de transposons lors de la différenciation des cellules germinales mâles d'*A. thaliana*, requiert la production de siARN spécifiques de ces éléments transposables par des cellules somatiques associées aux gamètes. Ces siARN migreraient ensuite vers les noyaux des gamètes. La production de ces siARN nécessite une activation transitoire de la transcription et de la transposition de ces transposons, mise en œuvre par des mécanismes épigénétiques (perte de la méthylation de ces ADN, et de l'expression de DDM1, une protéine de remodelage de la chromatine importante pour la formation d'hétérochromatine péricentromérique ; Slotkin et al., 2009). Un processus apparenté serait impliqué dans les organes sexuels femelles entre les cellules somatiques compagnons et les ovules (Olmedo-Monfil et al., 2010).

2.3.2. RNAi nucléaire dans les cellules somatiques différenciées et formation d'hétérochromatine

La méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN (RdDM, RNA-dependant DNA methylation) constitue un exemple majeur de l'activité nucléaire du RNAi permettant la mise en place de marques épigénétiques. Elle implique des siARN induisant directement la méthylation des cytosines de l'ADN dont la séquence est complémentaire au siARN. Ce mécanisme a été mis en évidence chez différentes espèces de plantes. Il cible principalement les séquences répétées ou transposables.

Chez *A. thaliana*, l'établissement de cette marque épigénétique requiert des DNMT (ADN-méthyltransférases, Chapitre I) spécifiques, et le RNAi. Des criblages génétiques ont révélé l'implication des protéines Dicer-like 3 (DCL3), Ago4, et RNA-Dependant RNA polymerase 2 (RDR2). L'ARN polymérase IV (RNA Pol IV) transcrirait différentes séquences d'ADN répété ou de transposons, générant ainsi les ARN précurseurs de siARN. Ces ARN précurseurs seraient convertis en ARNdb grâce à l'activité RdRP (RNA-dependant RNA Polymerase) de la protéine RDR2 permettant la synthèse d'ARN à partir d'une matrice ARN,

puis clivé par DCL3. RISC / Ago4 prend alors en charge les siARN ainsi produits, et cible les régions complémentaires de la chromatine. Ce complexe induirait alors le recrutement des DNMT (Chinnusamy and Zhu, 2009 ; Verdel et al., 2009).

La RdDM pourrait également être accompagnée par la formation d'une structure d'hétérochromatine, au moins au niveau de certaines régions. Ainsi, Ago4 et des siARN seraient impliqués non seulement dans la mise en place de la méthylation de l'ADN mais aussi de H3K9me au niveau de certains loci de transposons (Zilberman et al., 2003 ; Rowley et al., 2011).

La formation d'hétérochromatine dépendante du RNAi a été mise en évidence chez *S. pombe* (Volpe et al., 2002), pour laquelle le RNAi est essentiel à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive *de novo*. A ce jour, le seul complexe effecteur du RNAi nucléaire isolé a été purifié chez *S. pombe* : c'est le complexe RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing) qui contient lui aussi une protéine Argonaute, Ago1. La protéine Ago1 fixe le siARN, formant ainsi un élément de reconnaissance de la chromatine (Verdel et al., 2004 ; Verdel et al., 2009). Les mécanismes impliqués sont décrits dans le paragraphe suivant.

Le RNAi pourrait également être impliqué dans la formation de l'hétérochromatine chez d'autres eucaryotes. L'inactivation de Dicer dans des cellules hybrides humain-poulet conduit à la perte de la localisation des cohésines au niveau des centromères, et de HP1 au niveau des péri-centromères et induit également la levée du « silencing » des séquences répétées. Des défauts de ségrégation des chromosomes sont également observés (Fukagawa et al., 2004). Chez la drosophile, la RNase III Dcr2, ainsi que la protéine Argonaute Ago2 associée à des endo-siARN seraient impliquées dans la mise en place de la méthylation d'H3K9 et de HP1 au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique (Fagegaltier et al., 2009). De plus, différents mutants de protéines PIWI induisent la perte de H3K9me²⁻³ et de HP1 au niveau de l'hétérochromatine (Pal-Bhadra et al., 2004). Par ailleurs PIWI interagit directement avec HP1 (Brower-Toland et al., 2007). Des mécanismes similaires ont également été mis en évidence chez la souris (Kanellopoulou et al., 2005 ; Murchison et al., 2005).

2.4. Formation d'hétérochromatine dépendante du RNAi chez *S. pombe*

Les mécanismes impliqués dans la formation d'hétérochromatine dépendante du RNAi chez *S. pombe* sont les mieux définis au niveau des péricentromères.

2.4.1. RITS et le ciblage de la chromatine péricentromérique

Le modèle admis décrivant les mécanismes de formation de l'hétérochromatine par le RNAi suggère que celui-ci serait activé par la présence d'ARNdb issus soit de la transcription bidirectionnelle des séquences répétées des péricentromères par l'ARN polymérase II (Pol II, Figure 18), soit du repliement d'une molécule d'ARN simple brin générant ainsi une structure secondaire complexe de type épingle à cheveu (Djupedal et al., 2009). Ces ARN sont clivés par l'unique ribonucléase III de classe III identifiée chez *S. pombe*, Dcr1 (Dicer protein 1), qui produit des petits ARN doubles brins (siARN duplexe) de 22 à 25 nts de long (Figure 18 ; Volpe et al., 2002). Cette production aurait lieu dans le noyau *in cis* (Emmerth et al., 2010 ; Woolcock et al., 2011).

Ce petit ARN duplexe est pris en charge par Ago1, l'unique protéine Argonaute chez *S. pombe*. Deux protéines chaperonnes, Arb1 et Arb2, jouent un rôle essentiel dans le chargement du siARN dans Ago1 et dans la régulation de son activité « slicer », au sein du complexe ARC (Argonaute siRNA Chaperone ; Figure 19). Ce complexe permettrait la conversion du siARN duplexe en siARN en éliminant le brin passager (Buker et al., 2007).

Ago1, avec son siARN, s'associe alors à ses deux partenaires Chp1 et Tas3 (Targeting complex subunit 3) pour former le complexe effecteur RITS qui va cibler directement la chromatine (Verdel et al., 2004). Chp1 est une protéine à chromodomaine, et Tas3 est une protéine à domaine GW liant Ago1 et Chp1 (Petrie et al., 2005 ; Partridge et al., 2007 ; Debeauchamp et al., 2008). Le siARN constitue ainsi le premier élément de reconnaissance de la chromatine par le complexe RITS, permettant le ciblage d'un ARN en cours de polymérisation par l'ARN polymérase II et encore associé à la chromatine, selon le modèle de l'ARN naissant (Figure 18 et 19 ; Kato et al., 2005 ; Djupedal et al., 2005 ; Buhler et al.,

2006). Ainsi, dans ce mode de ciblage unique de la chromatine, l'ARN naissant sert de plateforme de recrutement et d'intermédiaire entre le complexe effecteur du RNAi et l'ADN.

Le chromodomaine de Chp1 représente le second module essentiel pour la reconnaissance et l'interaction stable de RITS avec la chromatine grâce à son association avec la méthylation H3K9 (Figure 18 et 19 ; Partridge et al., 2002 ; Schalch et al., 2009). Chez *S. pombe*, cette modification est catalysée par l'histone méthyltransférase Clr4, au sein du complexe CLRC. RITS recruterait CLRC à la chromatine, par l'intermédiaire de Stc1, une protéine à domaine LIM. Les domaines LIM présentent une structure en doigts de zinc associés en tandem, et ce domaine permet l'interaction de Stc1 à la fois avec Ago1 et avec CLRC (Bayne et al., 2010). Une protéine du complexe CLRC, Rik1, joue également un rôle essentiel dans l'interaction entre RITS et CLRC (Gerace et al., 2010). Avec l'établissement de H3K9me, la structure d'hétérochromatine est alors initiée, et les deux autres protéines à chromodomaine Swi6 et Chp2 essentielles à la structure même de l'hétérochromatine peuvent être recrutées (Figure 18 et 19 ; et Chapitre I paragraphe 1.2.3.2).

Une étude récente révèle l'existence d'une nouvelle classe de petits ARN associés à Ago1 et produits de manière indépendante de la RNase Dcr1 et du complexe RDRC (voir ci-dessous), les priARN (Halic and Moazed, 2010). Les auteurs suggèrent que ces priARN seraient produits à partir d'ARN issus de la transcription des séquences péri-centromériques. Ces ARN seraient clivés par l'exosome, une machinerie cellulaire cytoplasmique ou nucléaire constituée de plusieurs sous-unités et présentant une activité d'exoribonuclase 3'-5' (Figure 18). L'exosome est impliqué dans la maturation et la dégradation de plusieurs espèces d'ARN non codants (comme les ARN de transfert, ou ribosomaux). Il joue également un rôle important dans la dégradation d'ARNm aberrants (Houseley et al., 2006). Les travaux ayant mis en évidence les priARN montrent qu'Ago1 et les priARN sont capables d'induire la méthylation d'H3K9 générant ainsi des sites de nucléation de l'hétérochromatine (Figure 18). Toute la machinerie du RNAi pourrait être recrutée à ces sites, consécutivement à l'établissement de cette marque (Halic and Moazed, 2010).

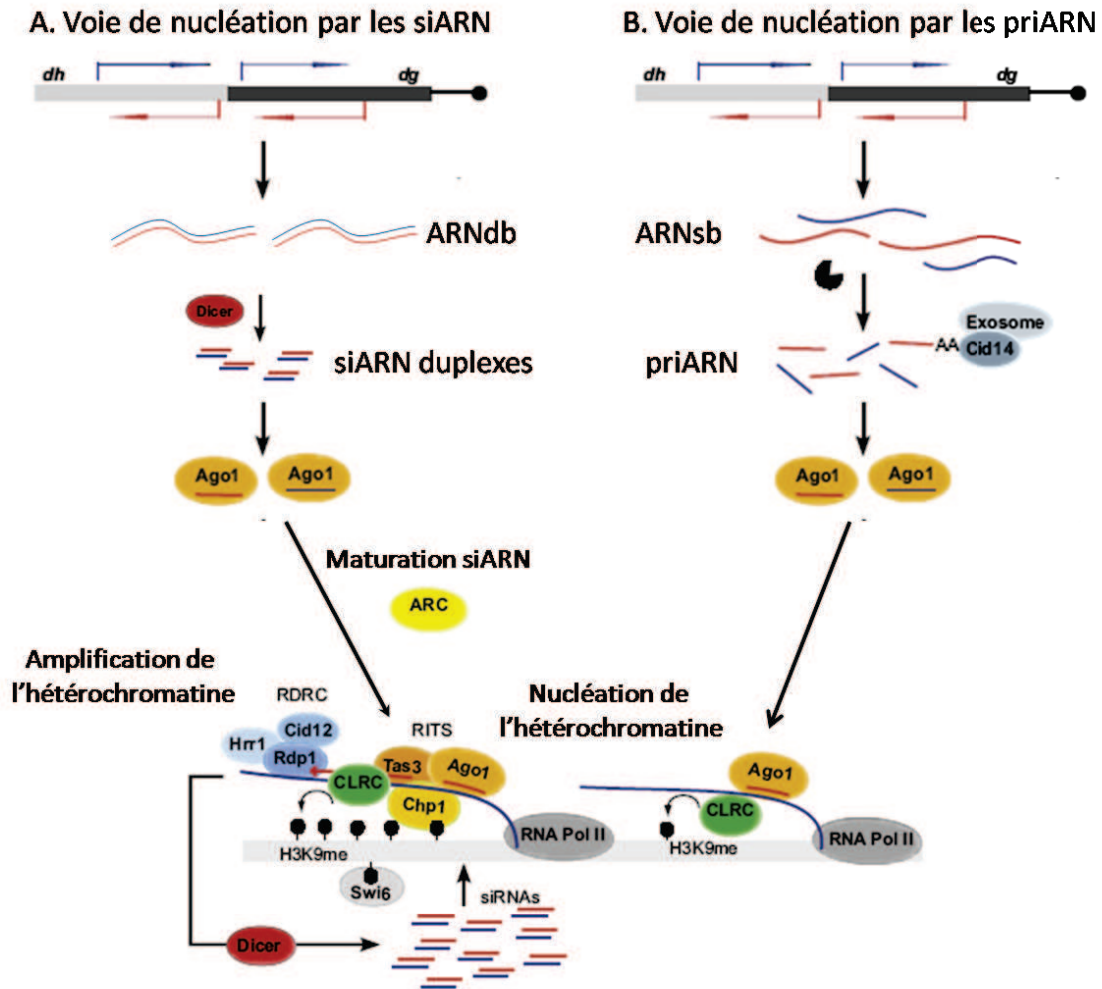


Figure 18. Deux modèles de nucléation de l'hétérochromatine par Ago1 et les petits ARN chez *S. pombe*. **A/** La transcription bidirectionnelle des régions des péricentromères (flèches bleues et rouges), active la voie du RNAi et des siARN (Dicer1). Ces petits ARN sont pris en charge par Ago1 et les siARN matures sont produits par ARC. **B/** La transcription bidirectionnelle des régions des péricentromères active la voie de l'exosome et des priARN, qui sont pris en charge par Ago1. Les complexes siRITS (A) ou priAgo1 (B) ciblent la chromatine via un ARN (trait bleu) en cours de transcription par l'ARN polymérase II (RNA Pol II). Les complexes siRITS (A) ou priAgo1 (B) induisent la méthylation H3K9 par CLRC, et ainsi le recrutement de Swi6. RDR1 et Dicer1 amplifient la production des siARN en *cis*. Voir le texte pour plus de détails. Adapté de Halic and Moazed, 2010.

La propagation de la structure d'hétérochromatine initiée par ces siARN primaires dépendant ou non de Dcr1 nécessite l'amplification des petits ARN.

2.4.2. Boucle d'amplification des siARN

L'amplification des siARN requiert le complexe RDRC (RNA-Directed RNA polymerase Complex), constitué de Rdp1, Hrr1 et Cid12 (Figure 19 ; Motamedi et al., 2004). Rdp1 présente une activité ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP ; Sugiyama et al., 2005), Hrr1 est une hélicase d'ARN, et Cid12 est une polymérase de queue polyA. Le complexe RITS interagit directement avec RDRC et permet son recrutement à la chromatine, afin d'initier la synthèse d'ARNdb à partir de l'ARN naissant par son activité RdRP (Motamedi et al., 2004). Cet ARNdb est clivé par Dicer, générant ainsi de nouveaux siARN, qui pourront être chargés dans RITS. Dicer est également ciblée à la chromatine (Woolcock et al., 2011), suggérant un mécanisme de production et d'amplification des siARN en *cis*, au niveau du site de recrutement de RITS (Figure 19).

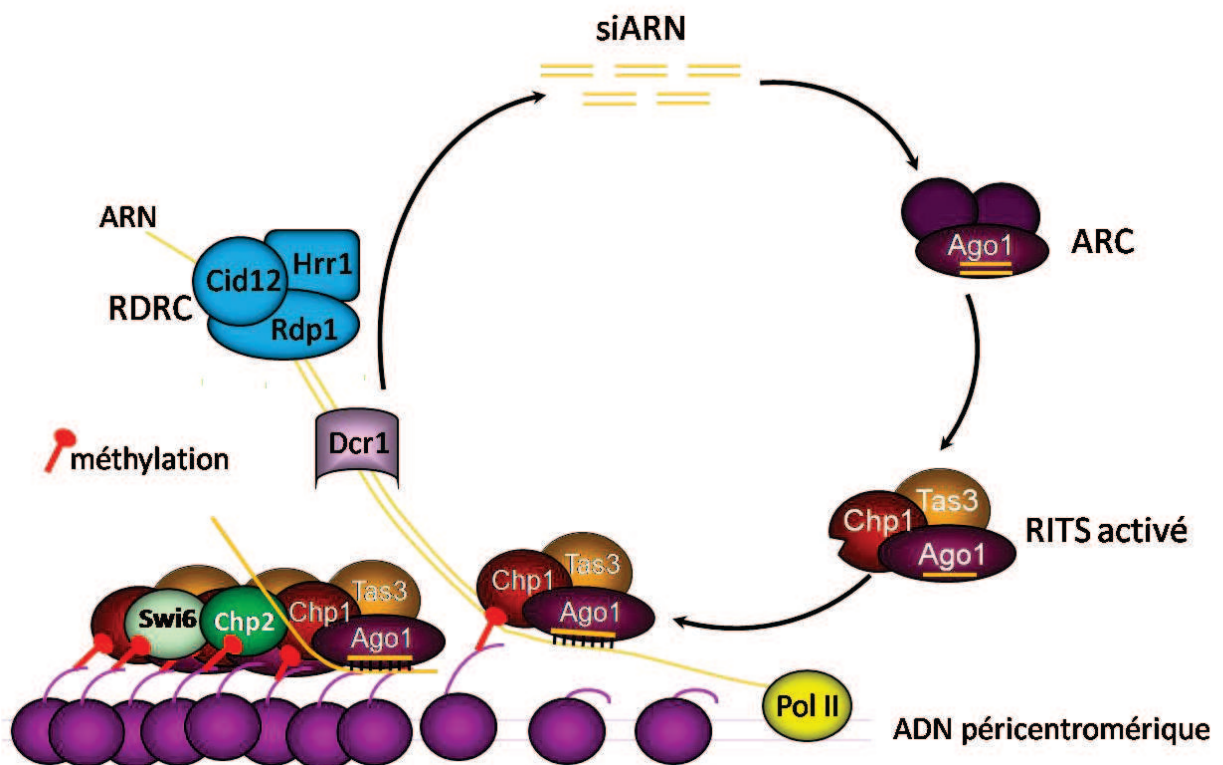


Figure 19. Boucle d'amplification des siARN et formation de l'hétérochromatine péricentromérique dépendante du RNAi. L'amplification des siARN duplexes est effectuée par RDRC et Dicer. Les siARN duplexes sont maturés par le complexe ARC, et pris en charge par RITS, qui cible la chromatine via un ARN (trait jaune) en cours de transcription par l'ARN polymérase II (Pol II), et la méthylation H3K9me (panneau rouge, sur nucléosomes violets). Voir le texte pour plus de détails.

2.4.3. Mécanismes du « silencing » médié par le RNAi

La formation d'hétérochromatine s'accompagne par la mise en place d'un « silencing » au niveau transcriptionnel, co-transcriptionnel, ou post-transcriptionnel en *cis*.

2.4.3.1. « Silencing » transcriptionnel

Une fois mises en place au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromérique par les mécanismes dépendants ou non du RNAi, les protéines Swi6 et de Chp2 servent de plateforme de recrutement pour différentes activités de modifications de la chromatine telles que les HDAC Clr6 et Clr3 (Bjerling et al., 2002 ; Kim et al., 2004 ; Zofall et al., 2009). Swi6 et Chp2 recrutent en particulier le complexe SHREC (Snf2/HDAC-containing Repressor Complex, Figure 20). Ce complexe associe l'HDAC Clr3 aux protéines Clr1 et Clr2, ainsi qu'à Mit1, une protéine de la famille des facteurs de remodelage de la famille SNF2, et induit un remodelage des nucléosomes pour limiter l'accessibilité de l'ARN polymérase II à l'ADN. Le complexe SHREC catalyse également la déacétylation de H3K14, essentielle au « silencing » transcriptionnel (Figure 20 ; Sugiyama et al., 2007 ; Motamedi et al., 2008).

Swi6 peut également induire le recrutement d'Epe1, une protéine à domaine JmjC (Jumonji C) agissant en régulateur négatif du « silencing » (Figure 20 ; Zofall and Grewal, 2006 ; Isaac et al., 2007). Le domaine JmjC pourrait comporter une activité de déméthylase d'histone (Trewick et al., 2005). Epe1 serait impliquée dans la régulation négative de la stabilité de liaisons entre protéines effectrices (Trewick et al., 2007), et elle favoriserait également la transcription (Zofall and Grewal, 2006). Swi6 permet ainsi de définir un équilibre entre « silencing » transcriptionnel et transcription des séquences péricentromériques, une transcription minimale étant essentielle à la formation de l'hétérochromatine (Grewal and Elgin, 2007).

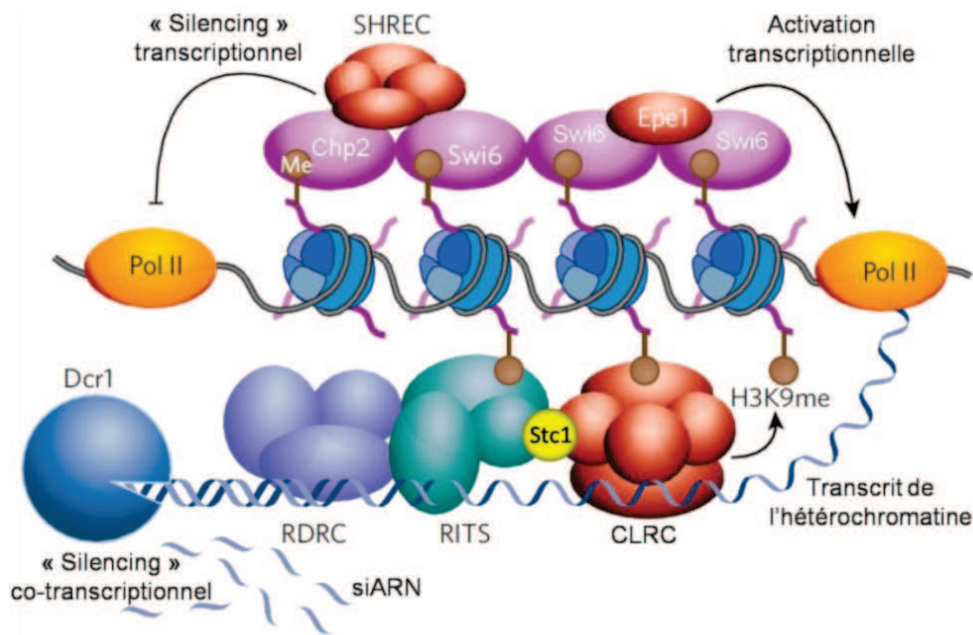


Figure 20. Equilibre entre le « silencing » transcriptionnel et l'activation de la transcription médié par Swi6 et Chp2. Voir le texte pour plus de détails. Adapté de Grewal and Elgin, 2007.

2.4.3.2. « Silencing » co-transcriptionnel

En plus du « silencing » transcriptionnel mis en place par Swi6 et Chp2, le RNAi peut induire un « silencing » co-transcriptionnel par l'intermédiaire de différents mécanismes.

Celui-ci peut provenir en premier lieu de l'activité « slicer » de Ago1 qui clive l'ARN en cours de transcription (Irvine et al., 2006 ; Figure 21).

Il a été montré que les enzymes Dcr1 et Rdp1 se localisent au niveau des régions d'hétérochromatine (Cam et al., 2005 ; Woolcock et al., 2011). Ainsi, le clivage par Dcr1 en *cis* de l'ARN naissant dont le brin complémentaire est synthétisé par RDRC permet également un « silencing » co-transcriptionnel (Noma et al., 2004 ; Figure 21).

Enfin, des facteurs d'épissage joueraient également un rôle dans le « silencing » co-transcriptionnel induit par le RNAi en *cis*, ainsi que dans la mise en place des marques de l'hétérochromatine (Bernard et al., 2010 ; Chinen et al., 2010), notamment grâce à l'interaction entre ces facteurs et Cid12, une sous-unité de RDRC (Bayne et al., 2008 ; Figure 21). Une des sous-unités à activité exonucléase de l'exosome, Dis3, est également impliquée dans le recrutement de certains de ces facteurs d'épissage (Bernard et al., 2010 ; Figure 21).

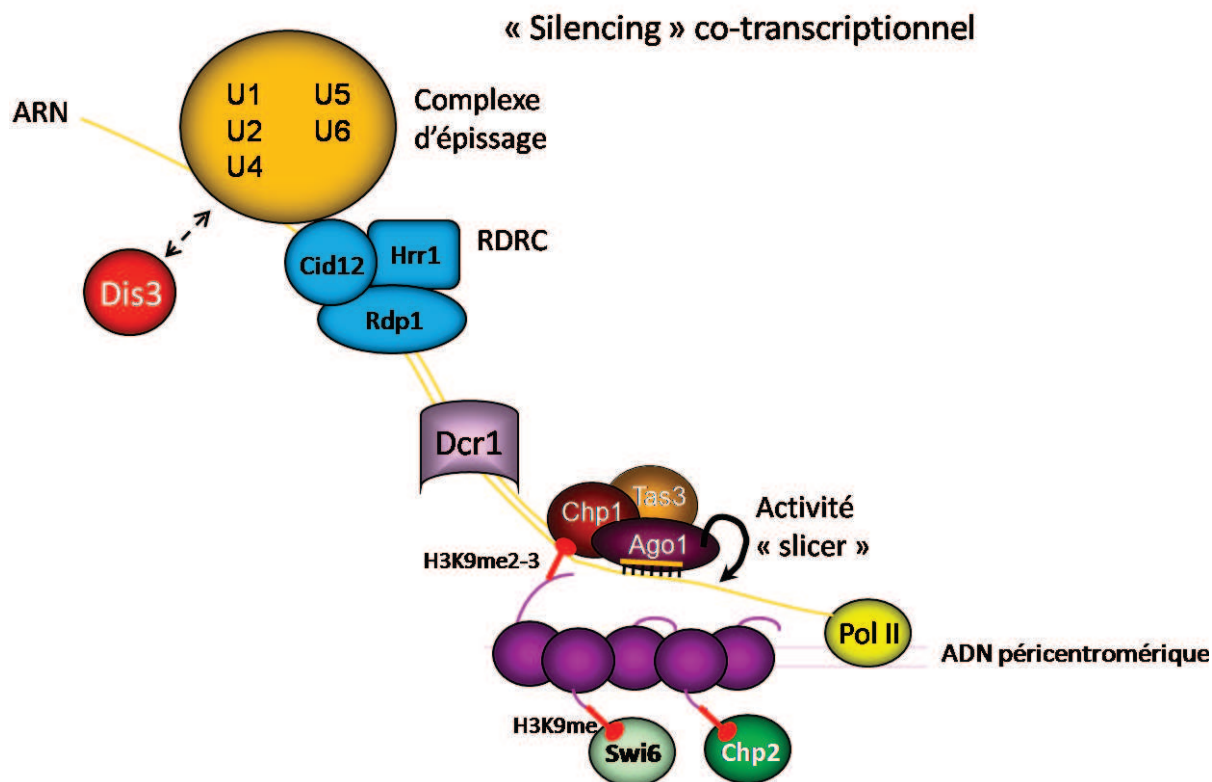


Figure 21. Le « silencing » co-transcriptionnel mis en place par le RNAi. Modèle du « silencing » co-transcriptionnel médié par le complexe d'épissage : Le complexe nucléoprotéique d'épissage des ARN serait recruté grâce à son interaction avec Cid12 et par Dis3, et s'assemble au niveau de l'ARN péricentromérique en cours de synthèse par l'ARN Pol II. Par ailleurs, la polymérisation du brin complémentaire activerait la dégradation de l'ARNdb par Dicer. Le « silencing » co-transcriptionnel implique également l'activité « slicer » de la protéine Ago1. Voir le texte pour plus de détails.

2.4.3.3. « Silencing » post-transcriptionnel

Le complexe TRAMP (Cid14/*Trf4*-Air1-Mtr4 Polyadenylation), constitué des sous-unités Cid14 (une poly-A polymérase), Air1 et Mtr4, et son activité de polymérisation polyA sont impliqués dans l'activation de la dégradation des transcrits péricentromériques par l'exosome nucléaire ou le duo RDRC / Dcr1 (Figure 22 ; Buhler et al., 2007 ; Wang et al., 2008). L'exosome peut présenter deux sous-unités catalytiques ayant chacune une activité exonucléase 3'-5' : les protéines Rrp6 et Dis3. Rrp6 est spécifiquement associée à l'exosome nucléaire (Allmang et al., 1999), à la différence de Dis3 qui peut agir dans l'exosome nucléaire et cytoplasmique (Dziembowski et al., 2007). Ces deux sous-unités jouent un rôle dans le maintien du « silencing » des régions d'hétérochromatine (Buhler et al., 2007 ; Wang et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré récemment que Mlo3, une protéine impliquée dans le

contrôle de la qualité et l'export des ARN vers le cytoplasme, interagit à la fois avec les complexes CLRC, RITS, et TRAMP. Ceci suggère que Mlo3 ferait ainsi le lien entre ces trois complexes effecteurs, et pourrait prendre en charge les transcrits péri-centromériques au site de production pour les guider vers TRAMP permettant ainsi leur dégradation (Zhang et al., 2011; Figure 22).

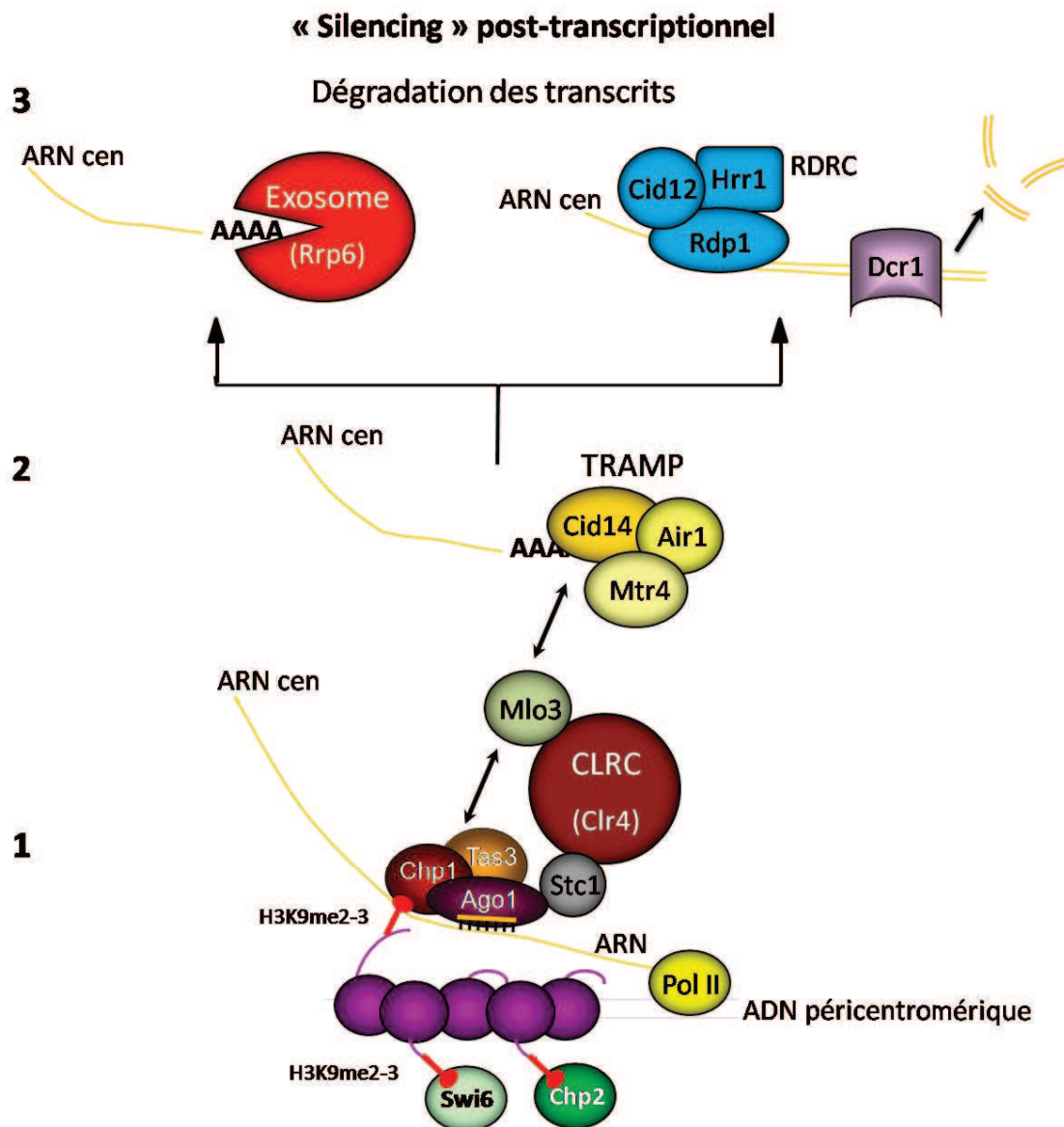


Figure 22. Mécanismes du « silencing » post-transcriptionnel médié par le complexe TRAMP. Le complexe TRAMP catalyse la polyadénylation de l'ARN centromérique. Cet ARN polyA est alors ciblé par l'exosome nucléaire ou par le RNAi (RDRC et Dcr1) pour être dégradé. Voir le texte pour plus de détails.

2.4.4. Les autres régions d'hétérochromatine constitutive

Les séquences homologues à *dh* présentes au niveau des régions subtélomériques et du locus du déterminisme sexuel servent de sites de nucléation de formation de l'hétérochromatine par le RNAi qui, en coopération avec les HDAC et Clr4, établit la marque H3K9me et le recrutement de Swi6 et Chp2. Les mécanismes mis en jeu par le RNAi seraient similaires à ceux décrits pour les péricentromères (Hall et al., 2002 ; Sadaie et al., 2004 ; Noma et al., 2004). On retrouve des siARN issus spécifiquement de ces régions. Après établissement de l'hétérochromatine, RITS, RDRC, et Dicer restent associés à l'hétérochromatine de manière dépendante de Clr4 (Cam et al., 2005). Cependant la présence de tous ces éléments du RNAi n'est pas requise pour maintenir la structure d'hétérochromatine et le « silencing » à ces régions (Hall et al., 2002 ; Petrie et al., 2005).

2.5. Implication du RNAi nucléaire dans le contrôle de gènes codants ?

Les régions du génome pour lesquelles un lien entre les mécanismes du RNAi et ceux de l'épigénétique a été mis en évidence sont essentiellement constituées de séquences non codantes, répétées ou transposables (voir le paragraphe 2.3). Ces séquences doivent en général être maintenues dans un état de « silencing » pour protéger l'intégrité du génome (Konkel and Batzer, 2010). Le RNAi nucléaire, à l'instar du RNAi cytoplasmique et des miARN, peut-il également cibler et/ou « silencer » des gènes codants ? Un exemple a été décrit chez les plantes, pour lesquelles des gènes régulateurs de la floraison seraient « silencés » par le RNAi nucléaire. Chez l'humain et le nématode, le RNAi nucléaire peut aussi cibler des transgènes par l'intermédiaire de siARN ou ARNdb synthétiques.

Chez les plantes, le mécanisme de méthylation de l'ADN médié par le RNAi (RdDM) cible essentiellement les transposons pour les inactiver (voir le paragraphe précédent). Dans certains cas, ce mécanisme affecte l'expression de gènes positionnés à proximité des transposons qu'il cible. C'est le cas par exemple du gène FLC (Flowering Locus C). Un transposon présent dans un intron de ce gène subit les mécanismes de la RdDM, provoquant la répression de l'expression de ce gène (Liu et al., 2004b ; Lippman et al., 2004). Le gène

FWA (Flowering Wageningen) subit également un « silencing » médié par la RdDM, notamment grâce à la présence de séquences répétées en tandem au niveau de son promoteur. Ces gènes sont ainsi soumis à une empreinte épigénétique, essentielle à l'inhibition de la floraison hors période propice (Chinnusamy and Zhu, 2009).

Différents travaux montrent que le RNAi peut sous certaines conditions induire le « silencing » transcriptionnel de gènes codants. Ces travaux sont basés soit sur l'insertion de transgènes comportant des séquences répétées ou génératrices d'ARN en épingle à cheveu, soit sur l'utilisation d'ARN simples ou doubles brins exogènes, qui activent la voie du RNAi de manière artificielle au niveau des ARN messagers ciblés. Par exemple chez la drosophile, l'insertion de transgènes au niveau des régions d'hétérochromatine, ou présentant des éléments répétés, induirait un « silencing » de ces gènes dépendant des protéines PIWI. L'établissement de ce « silencing » ferait appel à des protéines modificatrices de la chromatine de type Polycomb, et à HP1 (pour revue, Moazed, 2009).

Chez *C. elegans*, quelques études évoquent la possibilité de régulation de gènes par le RNAi au niveau transcriptionnel. Il a été montré que le « silencing » d'un transgène est induit au niveau transcriptionnel après ingestion par les animaux d'ARN homologues au transgène. Ce « silencing » dépend de plusieurs protéines du RNAi (Dicer et une protéine Argonaute Agl-1) et de Hpl-2, l'homologue de HP1, et conduit à la déacétylation des histones associées au locus du transgène (Grishok et al., 2005). Par ailleurs, une étude plus récente révèle que l'ingestion d'ARNdb homologues à des ARNm induit la production de siRNA spécifiques de ces ARNm. Ces siARN permettent le recrutement à leur chromatine d'une protéine Argonaute, NRD3, et provoquent l'inhibition de l'ARN Polymérase II au cours de la phase d'élongation de la transcription de ces gènes (Guang et al., 2010).

Dans les cellules humaines, des siARN synthétiques (21nts) complémentaires d'une région du promoteur d'un gène rapporteur, et transportés vers le noyau, induisent le « silencing » transcriptionnel du gène rapporteur, ainsi que la méthylation de l'ADN et des histones H3 au niveau de la chromatine de ce gène (Morris et al., 2004 ; Kawasaki and Taira, 2004). Ce « silencing » impliquerait notamment la protéine Argonaute Ago1 et l'ARN polymérase II, et serait dépendant de DNMT1 et de DNMT3b (Kim et al., 2006). Certains de ces travaux suggèrent que ces éléments seraient recrutés au niveau de l'ARN en cours de

polymérisation, toujours associé au promoteur, induisant ainsi un « silencing » transcriptionnel en *cis* (Han et al., 2007 ; Hawkins et al., 2009). Enfin, un exemple de régulation transcriptionnelle par un miARN endogène a été mis en évidence dans des fibroblastes humains : ce « silencing » impliquerait le recrutement d'Ago1 et l'HMT EZH2 au niveau de la chromatine du promoteur du gène cible, et induirait la tri-méthylation de H3K27 (Kim et al., 2008).

Chez *S. pombe* il a été montré que le RNAi nucléaire est lui aussi capable d'induire le « silencing » de transgènes insérés soit dans des régions d'hétérochromatine constitutives soit dans certaines régions d'euchromatine et dont la séquence permet la formation de structures secondaires en épingle à cheveu au niveau de l'ARN. Le RNAi y induirait la formation d'hétérochromatine permettant le « silencing » de ce transgène (Buker et al., 2007 ; Iida et al., 2008 ; Simmer et al., 2010).

Afin d'identifier des gènes codants ciblés par le RNAi, une étude comparative a été réalisée sur l'ensemble du transcriptome de *S. pombe* dans différents mutants du RNAi. Elle révèle une accumulation de 26 transcrits issus de gènes codants communs aux trois mutants individuels $\Delta dcr1$, $\Delta ago1$ ou $\Delta rdp1$. La délétion de *clr4* aurait peu d'effet sur le niveau de ces mêmes transcrits ce qui suggère que les gènes régulés par le RNAi ne seraient pas régulés de la même façon que les régions d'hétérochromatine constitutive. On peut ainsi supposer que cette régulation potentielle de gènes codants par le RNAi ne passerait pas par des modifications de la chromatine de ces gènes, et serait plutôt post-transcriptionnelle. Cependant, ces gènes communs aux trois mutants ne semblent présenter aucun lien apparent les uns avec les autres, aucun biais pour une fonction biologique quelconque n'ayant pu être établi (Hansen et al., 2005). Les approches visant à séquencer ou analyser l'ensemble des siARN associés à Ago1, et produits par Dcr1, montrent que ceux-ci correspondent essentiellement à des séquences complémentaires aux séquences répétées *dg* et *dh*. Ces études n'ont pas permis l'identification de siARN homologues à des gènes codants (Reinhart and Bartel, 2002 ; Buhler et al., 2008 ; Halic and Moazed, 2010).

D'autres études chez *S. pombe*, ont donné lieu à l'identification de gènes ciblés à la chromatine par le RNAi nucléaire. La cartographie de marques de l'hétérochromatine (H3K9me et Swi6) et de protéines du RNAi sur l'ensemble du génome de *S. pombe* a révélé

qu'Ago1 et H3K9me sont spécifiquement associées à au moins deux gènes, *mei4* (meiosis inducing gene 4) et *ssm4* (suppressor of *sme2* gene 4), suggérant pour la première fois que la fonction biologique du RNAi nucléaire puisse s'étendre à la régulation de gènes codants (Figure 23 ; Cam et al., 2005). Des travaux plus récents montrent que Dcr1 est également enrichi au niveau de la chromatine de ces gènes (Woolcock et al., 2011).

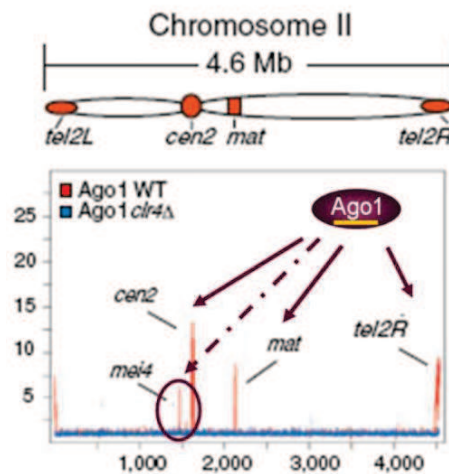


Figure 23. La protéine Ago1 est enrichie sur les sites d'hétérochromatine constitutive et sur la chromatine du gène *mei4*. Voir le texte pour les détails. Adapté de Cam et al., 2005.

Par ailleurs, deux autres études (Gullerova and Proudfoot, 2008 ; Gullerova et al., 2011) ont révélé qu'une forme d'hétérochromatine transitoire est mise en place au niveau de certains gènes par le RNAi lors de la mitose, au cours de la transition entre la phase G1 et la phase S, au moment où ces marques sont justement moins enrichies, et la transcription plus permissive, au niveau de l'hétérochromatine constitutive (Kloc and Martienssen, 2008). Ces gènes sont tous dans un contexte de convergence transcriptionnelle (Figure 24 A). Au cours de la phase G1, une terminaison de la transcription moins efficace au niveau de ces gènes induirait la génération d'ARNdb au niveau des régions intergéniques de ces gènes convergents, permettant l'activation du RNAi. La formation de cette structure d'hétérochromatine transitoire au niveau de l'ensemble du locus de ces gènes serait importante pour assurer le recrutement de cohésines au cours de la phase G2, permettant à la fois l'association des chromatides sœurs, de promouvoir la terminaison de la transcription des gènes convergents, et de limiter le recrutement du RNAi au niveau de ces gènes en

phase G2 (Gullerova and Proudfoot, 2008). De manière intéressante, 80% des gènes codants pour des protéines impliquées dans le RNAi sont convergents, et seraient eux-mêmes la cible de ce mécanisme, tel qu'*ago1*. Ce processus d'autorégulation serait important pour la régulation de la formation de l'hétérochromatine constitutive au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Gullerova et al., 2011).

Entre temps, deux études plus globales révèlent que le ciblage des gènes codants par le RNAi pourrait potentiellement être généralisé à l'ensemble des gènes convergents. Ces travaux ont montré que le RNAi, Clr4, TRAMP, l'exosome et le variant d'histone H2A.Z coopèreraient pour limiter la production des ARN issus du brin complémentaire (=ARN antisens) au niveau des gènes convergents (Zofall et al., 2009 ; Zhang et al., 2011 ; Figure 24 B). Cependant ce mécanisme ne concernerait que les ARN antisens, il ne semble pas impliqué dans la régulation du niveau de l'ARNm (ARN sens). De plus, bien que Clr4 soit important dans ce mécanisme, les données ne semblent pas corrélérer avec la formation d'une structure d'hétérochromatine au niveau de ces sites.

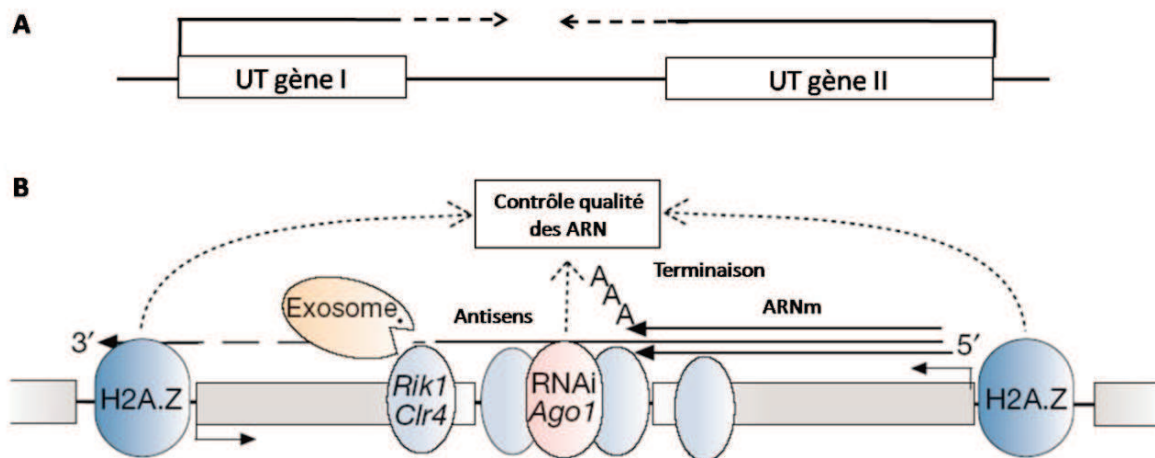


Figure 24. Implication du RNAi nucléaire au niveau de gènes convergents. A Représentation schématique d'un locus contenant deux gènes convergents. Les flèches représentent la transcription des unités transcriptionnelles (UT) de ces gènes. **B. Modèle de la terminaison de la transcription et de l'élimination des ARN antisens médiés par le RNAi en coopération avec H2A.Z** (Adapté de Zofall et al., 2009). Voir le texte pour les détails.

L'ensemble de ces travaux suggère que le RNAi nucléaire pourrait cibler la chromatine et potentiellement réguler l'expression de gènes codants en situation de

convergence transcriptionnelle. Cependant, la convergence ne suffit pas à expliquer le ciblage spécifique de la chromatine de gènes codants : en effet, parmi les deux gènes potentiellement ciblés eux aussi par le RNAi (Cam et al., 2005) *mei4* est convergent, alors que *ssm4* ne l'est pas.

Chapitre III

La différenciation sexuelle

3.1. La différenciation sexuelle, un processus fondamental de la reproduction

La différenciation des cellules est le processus par lequel une cellule développe une structure et une fonction spécialisées. Ce processus est particulièrement important pour les organismes pluricellulaires, pour lesquels chaque cellule doit assurer des fonctions précises en fonction de l'organe où elle se trouve. Ce processus implique une reprogrammation importante du schéma de l'expression des gènes induite par des signaux qui peuvent être environnementaux ou biochimiques (cytokines, hormones).

La différenciation des cellules germinales, ou différenciation sexuelle, est un processus crucial pour la reproduction sexuée et la transmission de l'information génétique de génération en génération chez tous les eucaryotes. Elle implique notamment une étape de méiose, permettant de générer des cellules haploïdes à partir des cellules germinales diploïdes, et des changements de morphologie importants, pour aboutir à la formation des gamètes.

S. pombe est une levure fissipare haploïde et unicellulaire qui prolifère par division mitotique dans un milieu favorable. Ce cycle de prolifération est aussi appelé cycle végétatif (Figure 25 A). En cas de privation de nutriments (source majeure d'azote et de glucose), les cellules s'arrêtent en interphase G1 (Gap1) du cycle végétatif (Figure 25 A). A ce stade, elles peuvent soit repartir dans un cycle végétatif si les nutriments sont à nouveau disponibles, soit entrer dans une phase de quiescence G0 (phase stationnaire dans laquelle les cellules ne se divisent plus), ou déclencher la différenciation sexuelle.

La différenciation sexuelle est initiée par la production des phéromones induisant la conjugaison de deux cellules haploïdes du type sexuel opposé (M/h- ou P/h+) (Figure 25 B).

Le type sexuel est imposé par la région du déterminisme sexuel, sous le contrôle de l'hétérochromatine (voir le chapitre I). La conjugaison permet la fusion des cellules et la formation du zygote diploïde, qui entre immédiatement en méiose. La méiose comprend plusieurs étapes successives. Après une étape initiale de réplication d'ADN, le zygote subit une première étape de division, la méiose I ou division réductionnelle, durant laquelle ont lieu les événements de recombinaison entre chromosomes homologues. La division réductionnelle permet la séparation des chromosomes homologues : un chromosome de chaque paire est distribué dans la cellule fille. Lors de la dernière étape de la méiose, la méiose II ou division équationnelle, les chromatides sœurs de chaque chromosome sont séparés et distribués dans les cellules filles. Les quatre cellules haploïdes issues de la méiose subissent une ultime différenciation morphologique appelée sporulation, qui aboutit à la formation de quatre ascospores, contenues dans un asque. (Figure 25 B). Ce processus permet à la fois un brassage génétique lors de la méiose, et l'adaptation des cellules à un environnement hostile par la formation de cellules plus résistantes (les ascospores). Lorsque les nutriments sont à nouveau en apport suffisant les spores germent, permettant le retour au cycle végétatif. Ainsi la différenciation sexuelle est un processus essentiel à la survie des cellules (Egel, 2004).

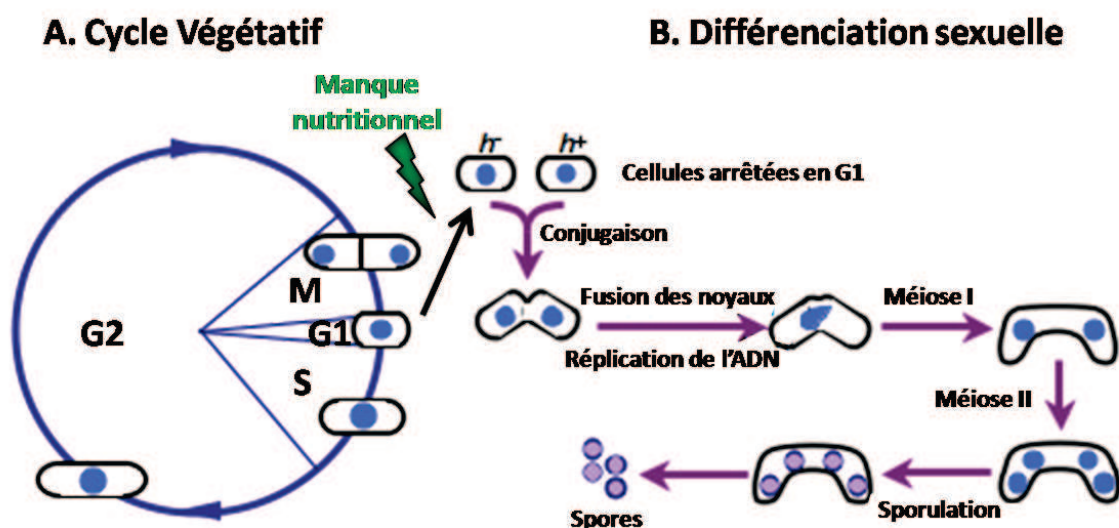


Figure 25. Représentation schématique du cycle végétatif et du cycle de la reproduction sexuelle chez *S. pombe*. A/ Le cycle végétatif ou mitotique se divise en quatre phases : Au cours d'une première phase de croissance assez brève, appelée interphase G1 (Gap1), les cellules préparent la réplication de l'ADN notamment en synthétisant les protéines requises. La phase S (Synthèse) ou

étape de réplication de l'ADN, est suivie d'une deuxième période d'interphase plus longue, la phase G2. La mitose permet la division de la cellule mère en deux cellules filles haploïdes, présentant chacune le même matériel génétique. **B/** Un manque nutritionnel stimule la différenciation sexuelle des cellules arrêtées en G1. Voir le texte pour plus de détails. Schéma extrait et adapté du site internet du laboratoire de M. Yamamoto (www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/yamamoto-lab).

Chez *S. pombe*, la différenciation sexuelle implique une importante reprogrammation de l'expression des gènes qui se déroule sur quatre phases. La première phase permet la mise en place de la réponse à la privation de nutriments et à la détection des phéromones, et conduit à l'induction de l'expression de gènes du métabolisme, du transport, de réponse aux stress, et de la conjugaison. La deuxième phase, caractérisée de « précoce » (= « early »), est essentielle à la réplication de l'ADN pré-méiotique et à la recombinaison, et induit l'expression de gènes impliqués dans le transport et la méiose. La méiose se poursuit au cours de la phase « intermédiaire » (= « middle »), avec l'activation de l'expression de l'ensemble des gènes requis pour les divisions méiotiques et les étapes précoces de la formation des spores. La dernière phase « tardive » (= « late ») provoque l'expression de gènes du métabolisme et du stress impliqués dans la maturation des spores (Mata et al., 2002 ; Mata et al., 2007 ; Wilhelm et al., 2008 ; et données du laboratoire).

3.2. Mécanismes d'inhibition de la différenciation sexuelle lors du cycle végétatif

3.2.1. Inhibition transcriptionnelle du facteur de transcription Ste11

Ste11 (Sterility protein 11) est le facteur de transcription clé de la différenciation sexuelle dont l'expression est induite essentiellement par la détection du manque nutritionnel dans les cellules haploïdes (Sugimoto et al., 1991). Ce facteur de transcription de type HMG (High Mobility Group) active la transcription de près de 80 gènes essentiels à la première phase de la différenciation sexuelle (Mata and Bahler, 2006). Il induit notamment l'expression des gènes requis pour la conjugaison, tels que les gènes codant pour les phéromones (Facteur-M ou Facteur-P) ainsi que pour leurs récepteurs (Aono et al., 1994). Il est également impliqué dans l'activation de la transcription du gène *mei2* (meiosis inducing

gene 2 ; Sugimoto et al., 1991 et voir le paragraphe suivant). Dans des cellules en cycle végétatif, la transcription du gène *ste11* est inhibée par deux voies de signalisation différentes, l'une dépendant de la source de carbone, et l'autre de la source d'azote (Figure 26 A).

La présence d'une source suffisante en carbone dans le milieu tel que du glucose est corrélée avec un niveau important d'AMP cyclique (AMPC) dans la cellule. Les protéines kinases dépendantes de l'AMPC (PKA) sont actives, et induisent l'inhibition de Rst2 (Recovery of *ste11* expression protein 2), un facteur de transcription avec un motif à doigt de zinc, et activateur de la transcription de *ste11* (Kunitomo et al., 2000 ; Higuchi et al., 2002 ; Valbuena and Moreno, 2010 ; Figure 26 A).

Le processus permettant aux cellules de détecter une privation en azote implique les protéines TOR (Target Of Rapamycin), des kinases à serine et thréonine. Au sein des complexes TORC (TOR complex), elles jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme et de la croissance chez tous les eucaryotes (Wullschleger et al., 2006). *S. pombe* exprime deux kinases TOR, Tor1, sous-unité du complexe TORC2 et Tor2, associée au complexe TORC1. Ces deux complexes sont impliqués dans l'inhibition de l'expression de Ste11 dans des cellules en cycle végétatif (Valbuena and Moreno, 2010 ; Figure 26 A). Le complexe TORC1 joue un rôle particulièrement important. En effet, la suppression du gène codant pour Tor2 conduit à l'activation de la différenciation sexuelle (Alvarez and Moreno, 2006).

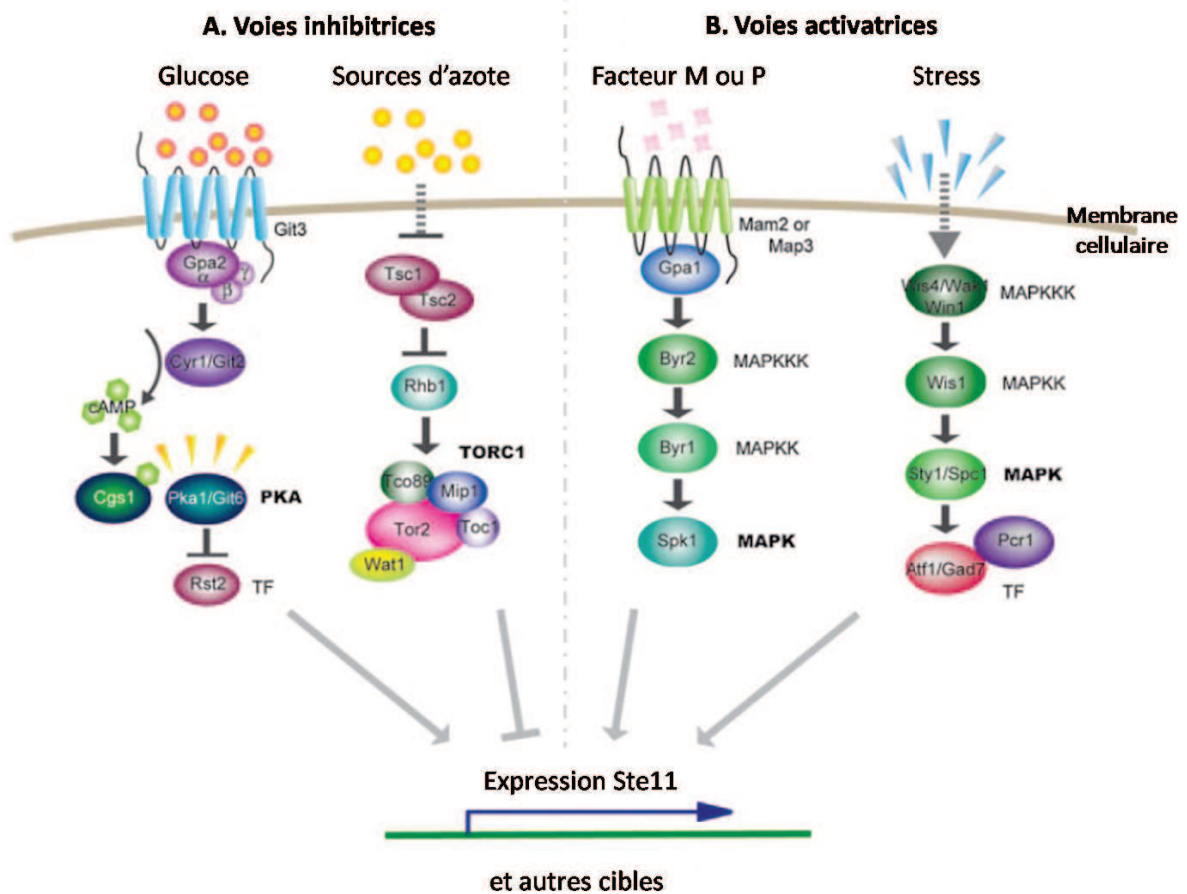


Figure 26. Les différentes voies de régulation de l'expression de Ste11, le facteur de transcription clé de la différenciation sexuelle. A. La voie des kinases PKA et de l'AMPC, ainsi que la voie des kinases TOR, jouent un rôle crucial dans l'inhibition de la transcription de *ste11*, le gène codant pour le facteur de transcription régulateur « Master » de la différenciation sexuelle. **B.** Deux voies indépendantes de MAPK activées par les phéromones ou le stress induisent l'expression du gène *ste11*. Voir le texte pour plus de détails. Adapté de Yamamoto, 2010.

3.2.2. Inhibition post-traductionnelle du régulateur Mei2

Chez *S. pombe*, la méiose est un processus inductible par défaut et inhibé dans les cellules en cycle végétatif par la kinase à sérine / thréonine Pat1. L'inactivation de Pat1 suffit pour déclencher la méiose jusqu'à la sporulation, même dans des cellules haploïdes (Iino and Yamamoto, 1985 ; Nurse, 1985). La cible principale de Pat1 est la protéine Mei2 (meiosis inducing protein 2), le régulateur majeur de la méiose. Mei2 est une protéine de liaison à l'ARN à domaine RRM (RNA Recognition Motif). Sa présence est requise pour le bon déroulement de la méiose : les cellules $\Delta mei2$ sont capables de conjuguer mais elles restent

bloquées avant la réplication de l'ADN (Watanabe and Yamamoto, 1994). Au cours du cycle végétatif, Mei2 est phosphorylée par Pat1 au niveau de la sérine 438 et la thréonine 527 (Figure 27). Ces phosphorylations sont cruciales pour l'inhibition de la méiose (Watanabe et al., 1997). Elles conduisent d'une part à la déstabilisation de Mei2 en favorisant notamment sa dégradation par le protéasome (Kitamura et al., 2001), une machinerie cellulaire conservée chez les eucaryotes, dédiée à la dégradation des protéines reconnues comme aberrantes. D'autre part, elles favorisent l'association de Mei2 à Rad24 (Radiation protein 24), la protéine de type 14-3-3 majeure chez *S. pombe*, inactivant ainsi la fonction de Mei2 (Sato et al., 2002 ; Figure 27). Les protéines 14-3-3, conservées chez les eucaryotes interagissent avec des protéines de différentes voies de signalisation afin de moduler leur activation (Morrison, 2009).

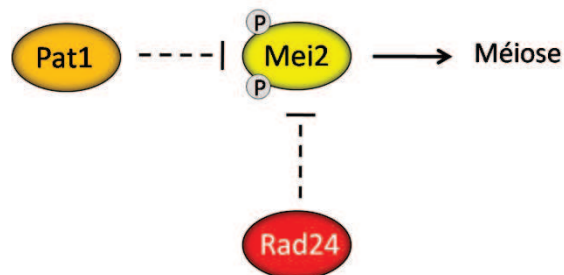


Figure 27. Inhibition post-traductionnelle du régulateur méiotique Mei2, induite par la phosphorylation par Pat1 et l'association à Rad24. Voir le texte pour plus de détails.

3.2.3. Inhibition post-transcriptionnelle de gènes méiotiques par la protéine Mmi1

3.2.3.1. Identification des gènes cibles de Mmi1

La méiose est inhibée par un mécanisme supplémentaire permettant la répression au niveau post-transcriptionnel de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle (Harigaya et al., 2006). Il met en jeu la protéine Mmi1 (Meiotic mRNA interception protein 1), une protéine de liaison à l'ARN présentant un domaine YTH (YT521-B Homology ; Stoilov et al., 2002). Ce domaine conservé chez les eucaryotes permettrait l'interaction avec un motif hexamérique au consensus dégénéré (Zhang et al., 2010). Il serait impliqué dans l'interaction de Mmi1 avec ses ARN cibles, grâce à la reconnaissance d'une région minimale de ces ARN appelée DSR (Determinant of Selective Removal ; Harigaya et al., 2006). Une

étude de transcriptomique a permis d'identifier une douzaine de gènes dont les transcrits s'accumulent dans un mutant thermosensible de Mmi1 (Table 1A). Ces gènes sont tous exprimés spécifiquement pendant la différenciation sexuelle, et la plupart durant la phase précoce. Des expériences de retard sur gel ont permis de confirmer l'interaction directe de Mmi1 avec quatre des ARN de ces gènes codants : *mei4*, *ssm4*, *spo5*, *rec8* (Table 1 A), pour lesquels la région DSR a été identifiée (Harigaya et al., 2006). Une étude plus récente a conduit à l'identification de huit gènes codants méiotiques supplémentaires potentiellement régulés par Mmi1 (et un gène orphelin ; Table 1 B ; Cremona et al., 2011). Les auteurs de cette étude montrent par ailleurs que l'absence de Mmi1 conduit à l'accumulation d'ARN polyadénylés issus de tous les gènes cibles de Mmi1 (Cremona et al., 2011).

A. Gènes régulés par Mmi1, identifiés par Harigaya et al., 2006.

Nom du gène	Identification de l'ORF	Fonction	Classification
<i>mei4</i>	SPBC32H8.11	Facteur de transcription	Intermédiaire
<i>meu26</i>	SPAC6B12.16	-	Intermédiaire
<i>crs1</i>	SPBC2G2.09c	Cycline	Précoce
<i>mug9</i>	SPCC70.09c	-	Précoce
<i>meu1</i>	SPAC1556.06	Gène orphelin	Intermédiaire
<i>rec8</i>	SPBC29A10.14	Sous-unité cohésine	Précoce
<i>bqt1</i>	SPAC6G9.13c	Sous-unité bouquet télomères	Précoce
<i>dil1</i>	SPAC458.04c	Sous-unité dynéine	Précoce
<i>mug1</i>	SPCC11E10.03	Sous-unité complexe dynactine	Précoce
<i>ssm4</i>	SPAC27D7.13c/SPAC637.01	Protéine associée aux microtubules nucléaires	Précoce
<i>spo5</i>	SPBC29A10.02/SPBC365.18	Protéine de liaison à l'ARN	Précoce
<i>rec25</i>	SPAC17A5.18c	Ségrégation des chromosomes et recombinaison	Précoce

B. Gènes supplémentaires régulés par Mmi1, identifiés par Cremona et al., 2011.

Nom du gène	Identification de l'ORF	Fonction	Classification
<i>meu13</i>	SPAC222.15	Ségrégation des chromosomes et recombinaison	Précoce
<i>ght3</i>	SPAC1F8.01	Transporteur d'hexoses	Précoce
<i>meu21</i>	SPAC24C9.07c	Sous-unité synthase du glucane	Intermédiaire
<i>mug131</i>	SPBC1861.06c	-	Intermédiaire
<i>mcp4</i>	SPBC16E9.08	Protéine de la membrane des pro-spores	Intermédiaire
<i>meu6</i>	SPBC428.07	Ségrégation des chromosomes	Intermédiaire
<i>mpf1</i>	SPAC4G9.05	Protéine de liaison à l'ARN	Intermédiaire
<i>mug142/erf2</i>	SPBC3H7.09	Palmitoyl-transférase	Intermédiaire
-	SPAPB17E12.09	Gène orphelin	Intermédiaire

Table1. Liste des gènes potentiellement régulés par Mmi1. **A.** Gènes cibles identifiés initialement par Harigaya et al., 2006. **B.** Gènes supplémentaires identifiés lors d'une seconde étude (Cremona et al., 2011). La colonne classification dans la méiose fait référence à la classification établie suite à l'étude de l'expression de l'ensemble du génome au cours de la différenciation sexuelle par Mata et al., 2002 (voir le texte pour plus de détails).

L'inactivation de Mmi1 dans des cellules haploïdes végétatives provoque d'importants défauts de croissance liés à la dé-répression de l'expression de ses gènes méiotiques cibles, et particulièrement celle du gène *mei4* (meiosis inducing gene 4), la délétion de ce dernier permettant d'alléger ces défauts (Harigaya et al., 2006). Le gène *mei4* code pour un facteur de transcription comportant un domaine de liaison à l'ADN de type « forkhead », lui permettant de reconnaître et de se lier à des séquences particulières de l'ADN retrouvées au niveau du promoteur de ses gènes cibles, les séquences FLEX (Horie et al., 1998 ; Abe and Shimoda, 2000). Le gène *mei4* est essentiel au bon déroulement de la différenciation sexuelle à partir de la méiose I (Bresch et al., 1968). Mei4 permet la mise en place de l'ensemble du programme transcriptionnel de la phase « intermédiaire » (à partir de la division réductionnelle I) et d'une partie du programme de la phase tardive (sporulation), en activant directement ou non l'expression de près de 500 gènes (Horie et al., 1998 ; Abe and Shimoda, 2000 ; Watanabe et al., 2001 ; Mata et al., 2002 ; Murakami-Tonami et al., 2007 ; Mata et al., 2007 ; Moldon et al., 2008). Il est également capable d'activer sa propre expression (Abe and Shimoda, 2000). Les mécanismes permettant l'induction de l'expression de ce gène ne sont pas connus, cependant l'activation artificielle de l'expression de *mei4* dans des cellules haploïdes provoque l'induction d'une méiose incomplète et anormale, délétère pour la cellule (Nakase et al., 2009).

3.2.3.2. Mécanisme de régulation post-transcriptionnelle par Mmi1

i) Etablissement d'une queue polyA minimale sur les ARN

Une fois fixée sur la région DSR, la protéine Mmi1, qui n'a pas d'activité de nucléase, va induire la dégradation de l'ARN en recrutant différents complexes protéiques effecteurs. Selon le modèle proposé par la Figure 28, Mmi1 pourrait dans un premier temps recruter le complexe de polyadénylation des ARN, grâce à l'interaction physique avec les deux sous-unités Pla1 et Rna15 (Yamanaka et al., 2010). Pla1 est une polyA polymérase (Ohnacker et al., 1996), et Rna15 est une sous-unité du facteur de clivage des ARN CF1A (Cleavage Factor A), qui, associé au complexe de polyadénylation, induit le clivage de l'ARN au site de polyA et sa polyadénylation (Hammell et al., 2002). L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines induit l'accumulation des ARN cibles de Mmi1 (Yamanaka et al., 2010). Deux autres protéines impliquées elles aussi dans le clivage de l'ARN et l'établissement de la queue polyA

ont été identifiées comme importante pour la régulation de la terminaison de la transcription médiée par Mmi1 pour le gène *crs1* (McPheeters et al., 2009), un des gènes cibles de Mmi1 (Harigaya et al., 2006) : les protéines Dhp1 (Shobuike et al., 2001) et Pfs2 (Ohnacker et al., 2000 ; Figure 28 A).

L'établissement de la queue polyA au niveau des ARN ciblés par Mmi1 serait également favorisé par un autre facteur, Red1. L'absence de Red1 induit l'accumulation des ARN cibles de Mmi1 (Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011). Par ailleurs, Red1 interagit directement avec les ARN cibles de Mmi1, avec Pla1, et dans une moindre mesure avec Mmi1 elle-même, suggérant que Red1 en coopération avec Mmi1, recruterait Pla1 sur ces ARN (Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011 ; Figure 28 A).

Cependant les mécanismes mis en jeu pour la polyadénylation des ARN ciblés par Mmi1 sembleraient plus complexes que le modèle présenté ici (Figure 28). En effet, les ARN s'accumulant en l'absence de Mmi1 sont polyadénylés (Cremona et al., 2011). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme de polyadénylation de ces ARN indépendant de Mmi1.

ii) Recrutement de Pab2 sur la queue polyA

Ces différents facteurs permettraient l'établissement d'une queue polyA minimale, un pré-requis pour le recrutement stable de la protéine Pab2 (PolyA binding 2) par Mmi1 (Yamanaka et al., 2010 ; St-Andre et al., 2010 ; Figure 28 B). La protéine Pab2 s'associe spécifiquement aux queues polyA des ARN polyadénylés, et elle est impliquée dans le contrôle de leur taille (Perreault et al., 2007). L'interaction entre Pab2 et Mmi1 est essentielle pour l'inhibition de l'expression des gènes cibles de Mmi1 (Yamanaka et al., 2010 ; St-Andre et al., 2010).

Il a été montré pour au moins un des gènes cibles de Mmi1, le gène *crs1*, que Mmi1 induit également une inhibition de l'épissage des introns de ce gène (Figure 28 B ; MCPheeters et al., 2009).

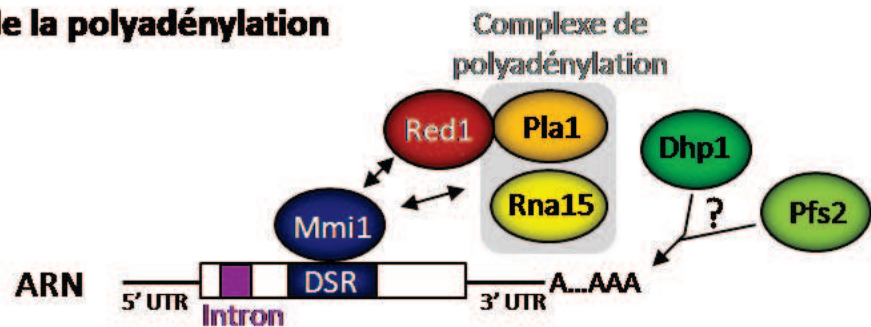
La combinaison de tous ces éléments affecte la stabilité de l'ARN, et facilitent sa dégradation de celui-ci par l'exosome.

iii) Recrutement de l'exosome nucléaire

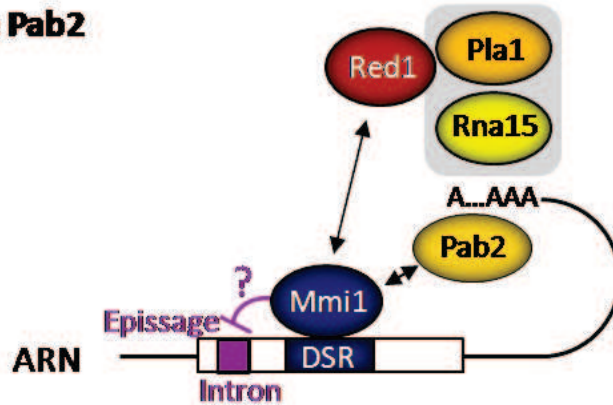
Pab2 induirait alors le recrutement de l'exosome nucléaire en coopération avec Mmi1 (Figure 28 C). Les deux sous-unités Rrp6 et Dis3 sont essentielles pour la dégradation des ARN ciblés par Mmi1 (McPheeters et al., 2009 ; Yamanaka et al., 2010 ; St-Andre et al., 2010 ; Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011 ; Cremona et al., 2011). Par ailleurs, Mmi1 et

Red1 interagiraient avec Rrp6, favorisant ainsi le recrutement de l'exosome (Harigaya et al., 2006 ; Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011). Une fois recruté, celui-ci induirait la dégradation de ces ARN (Figure 28 C).

1. Etablissement de la polyadénylation



2. Recrutement de Pab2



3. Dégradation par l'exosome

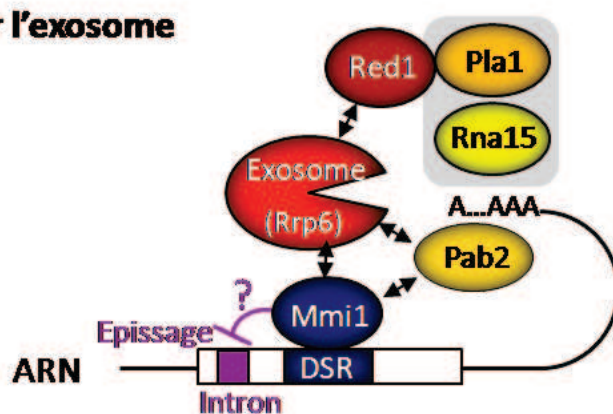


Figure 28. Modélisation des mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'expression de gènes méiotiques médiée par Mmi1. Voir le texte pour plus de détails.

3.3. Déclenchement de la différenciation sexuelle chez *S. pombe*

3.3.1. Activation du programme transcriptionnel initiateur

Différentes voies indépendantes sont impliquées dans l'activation de la transcription du gène *ste11* dans les cellules haploïdes bloquées en phase G1. La privation de nutriments conduisant à l'inactivation des voies inhibitrices des kinases PKA et TOR décrites ci-dessus et à l'activation de la voie de réponse au stress, combinée à la détection des phéromones du type sexuel opposé aboutissent à l'expression du gène *ste11*, et par conséquent de l'ensemble du programme transcriptionnel de la première phase de la différenciation sexuelle (Figure 26).

La diminution de la concentration en source de carbone induit l'inhibition des kinases PKA et la libération de Rst2, le facteur de transcription activateur de l'expression de *ste11* (Figure 26 A ; Valbuena and Moreno, 2010). Par ailleurs, la diminution de la concentration en source d'azote permet l'inhibition des kinases TOR, et l'activation subséquente de l'expression de *ste11* par des mécanismes encore mal définis (Figure 26 A ; Valbuena and Moreno, 2010).

Le manque de nutriments active également la voie de réponse au stress. Celle-ci est essentiellement médiée par des kinases MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Le stress induit l'activation de ces kinases à sérine/thréonine par des phosphorylations successives (Samejima et al., 1997). La MAPK Sty1 activée phosphoryle alors les facteurs de transcription associés Atf1 / Pcr1 (décrits dans le paragraphe 1.3.2.) qui augmentent la transcription de *ste11* (Figure 26 B ; Watanabe and Yamamoto, 1996 ; Wilkinson et al., 1996).

Enfin, la proximité d'une cellule de type sexuel opposé est détectée par son émission de phéromone. Une cellule P (h+) émet une phéromone de type Facteur-P, une petite protéine de 23 acides aminés, et une cellule M (h-) produit un peptide de neuf acides aminés, le Facteur-M (Yamamoto, 2010). La fixation d'une phéromone à son récepteur produit par une cellule du type opposé permet l'activation d'une autre voie de kinases MAPK, qui permet d'augmenter l'expression de *ste11* (Figure 26 B ; Kjaerulff et al., 2005).

Les gènes requis pour la conjugaison voient leur expression activée par Ste11, et notamment le gène codant pour la phéromone, ce qui permet la conjugaison avec la cellule du type sexuel opposé suffisamment proche.

3.3.2. Neutralisation des inhibiteurs Pat1 et Mmi1

Après la conjugaison, le zygote est diploïde et porte un allèle actif du gène *mat1-Pi(m)* (P induced) au niveau du locus *mat1* du chromosome II provenant de la cellule mère du type P, et un allèle actif du gène *mat1-Mc* (M constitutive) sur l'autre chromosome II. Ste11 active l'expression de ces deux gènes dont les produits sont des facteurs de transcription qui s'associent afin d'activer l'expression d'autres gènes essentiels à la différenciation, en particulier le gène *mei3* (Van Heeckeren et al., 1998 ; Figure 29). Mei3 est un pseudo-substrat inhibiteur de la kinase Pat1 qui entre en compétition avec son substrat naturel Mei2 empêchant ainsi sa phosphorylation (Figure 29).

Mei2 non phosphorylée est alors activée, et peut s'associer à sa cible, l'ARN non codant *meiARN* (Figure 29 ; Watanabe and Yamamoto, 1994). Cet ARN polyadénylé d'environ 0,5kb est transcrit à partir du gène non codant *sme2*. Il est essentiel pour la différenciation sexuelle, la délétion de *sme2* induisant un blocage avant la réplication de l'ADN, de la même façon que la délétion de *mei2*. L'interaction de Mei2 avec *meiARN* faciliterait la pénétration ou la séquestration du complexe Mei2-*meiARN* dans le noyau (Yamashita et al., 1998 ; Sato et al., 2001). Le complexe Mei2-*meiARN* s'associe alors aux deux chromosomes II, au niveau du locus du gène *sme2*, pour former un point appelé le « *mei2-Dot* » (Shimada et al., 2003), et y recruter Mmi1 (Harigaya et al., 2006). Cette relocalisation de Mmi1 serait essentielle pour lever l'inhibition post-transcriptionnelle qu'il impose à ses cibles (Figure 29). Des données génétiques confirment ce modèle puisque le blocage de la méiose dû à la délétion de *sme2* est contrecarré par l'inactivation de Mmi1 ou de ses partenaires (Pab2, Pla1, ou encore Rna15). La principale fonction du « *mei2-Dot* » serait donc de séquestrer Mmi1, pour libérer ses ARN cibles (Harigaya et al., 2006 ; Yamanaka et al., 2010 ; St-Andre et al., 2010 ; Figure 29).

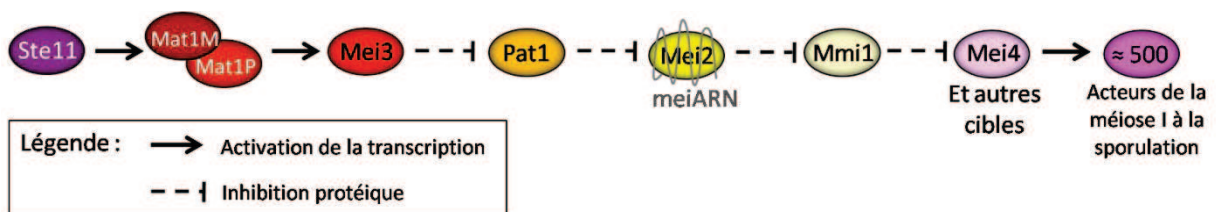


Figure 29. L'activation de la méiose implique l'inhibition de Mmi1, un processus multi-étape. Représentation schématique des mécanismes conduisant à l'activation des gènes cibles du facteur de transcription Mei4. Voir le texte pour plus de détails.

3.3.3. Activation du programme transcriptionnel de la méiose et la sporulation

Après la première phase de la différenciation (réponse au manque nutritionnel et aux phéromones, émission des phéromones puis conjugaison), plusieurs facteurs de transcription sont requis pour la progression dans la différenciation sexuelle. La mise en place de la phase « précoce » de la méiose (incluant la réplication de l'ADN et la recombinaison) requiert l'activation du facteur de transcription à doigt de zinc Rep1 (Sugiyama et al., 1994 ; Mata et al., 2007) par Ste11 (Mata and Bahler, 2006). La protéine Mei4 active l'ensemble du programme transcriptionnel de la phase intermédiaire de la méiose (voir le paragraphe 3.2.3.1.). Après les divisions méiotiques, des facteurs de transcription à domaine « leucine zipper » de la famille ATF (Atf21 et Atf31), ainsi que Rsv1 et Rsv2, deux facteurs à doigt de zinc sont indispensables pour piloter les changements morphologiques permettant la formation des spores lors de la dernière phase de la différenciation sexuelle (Mata et al., 2002 ; Mata et al., 2007). Un apport de nutriments suffisant, et notamment de glucose, induit l'augmentation du niveau d'AMPC et l'activation des PKA, permettant la germination des spores, et la reprise du cycle végétatif (Hatanaka and Shimoda, 2001).

3.3.4. Protéines de liaison à l'ARN, ARNnc, et dégradation sélective d'ARNm dans la différenciation sexuelle chez les eucaryotes supérieurs

L'étude des mécanismes de la différenciation sexuelle chez *S. pombe* a permis de révéler le rôle majeur joué par un ARNnc (*meiARN*), ainsi que par des protéines de liaison à l'ARN telles que Mei2 et Mmi1, et par l'exosome nucléaire (Rrp6). De tels mécanismes pourraient être conservés chez d'autres organismes. Ainsi, une étude chez *S. cerevisiae* révèle l'accumulation d'ARNnc au cours de l'induction de la différenciation sexuelle, lesquels seraient soumis à la dégradation par un mécanisme de régulation post-transcriptionnel impliquant Rrp6, la sous-unité de l'exosome nucléaire, lors du cycle végétatif (Lardenois et al., 2011). Par ailleurs chez *Arabidopsis*, les protéines AMLs (*Arabidopsis mei2-like*) à domaine RRM jouent un rôle important lors de la méiose (Charon et al., 2010).

Chez les autres eucaryotes supérieurs, la différenciation sexuelle implique la mise en place d'une régulation post-transcriptionnelle des ARNm (Lee et al., 2009), et le mécanisme de contrôle de la différenciation sexuelle par une protéine liant l'ARN, tel que Mmi1 chez *S. pombe*, pourrait être également retrouvé. En effet, une famille de protéines de liaison à l'ARN a été identifiée pour son rôle essentiel dans la gamétogénèse, les protéines DAZ (Deleted in Azoospermia). L'expression de ces protéines est restreinte aux cellules germinales. Cette famille de protéines est retrouvée chez la plupart des eucaryotes supérieurs (humain (Boule, Daz et Daz-like), grands singes, rat et souris (Dazla), poulet (cDazl), xénope, poisson zèbre ou truite (Dazl), drosophile (Boule), *C. elegans* (Daz-1), etc. ; Eirin-Lopez and Ausio, 2011). Les mécanismes impliqués dans la régulation par ces protéines restent à explorer, cependant quelques travaux suggèrent que leur liaison au 3'UTR des ARNm, ainsi que leur interaction avec la protéine PABP, favoriseraient la polyadénylation et l'initiation de la traduction des ARN ciblés (Collier et al., 2005 ; Takeda et al., 2009 ; Brook et al., 2009), évoquant ainsi les mécanismes mis en jeu par Mmi1 et la protéine Pab2.

3.4. RNAi et différenciation sexuelle ?

Outre son rôle dans la mise en place du « silencing » des régions non appariées chez les champignons filamenteux et *C. elegans* ou des transposons chez *A. thaliana*, et dans l'élimination d'ADN chez les paramécies (paragraphe 2.3.2.), le RNAi a été impliqué dans le processus de la méiose chez la plupart des eucaryotes.

Chez *S. pombe*, le RNAi nucléaire joue un rôle fondamental lors de la mitose, mais aussi lors de la méiose. En effet, l'hétérochromatine doit être intègre au niveau des péricentromères pour la bonne formation des kinétochores, au niveau des régions du déterminisme sexuel pour le changement de type sexuel, et au niveau des télomères pour une bonne répartition des chromosomes dans les cellules filles (Hall et al., 2003 ; voir le chapitre I). Le RNAi cytoplasmique pourrait également jouer un rôle supplémentaire au cours de l'induction de la méiose, indépendant du maintien des structures d'hétérochromatine constitutive. Le groupe de TC. Hobman a montré que le RNAi serait important pour le blocage des cellules en phase G1 précédant la mise en place de la méiose,

en agissant sur la kinase cycline-dépendante Cdc2 qui constitue le régulateur central du cycle cellulaire mitotique et méiotique chez *S. pombe*. L'état de phosphorylation de Cdc2 détermine son état activé ou inactivé : sa déphosphorylation est requise pour passer le point de contrôle de la phase G1, et pour activer la phase S pré-méiotique puis les deux divisions nucléaires. Les travaux de ce groupe suggèrent qu'Ago1 et Dcr1 sont impliquées dans la régulation de la phosphorylation de Cdc2 (Carmichael et al., 2004), probablement via l'interaction d'Ago1 avec la protéine de type 14-3-3, Rad24 (Stoica et al., 2006).

Le RNAi est également impliqué dans le processus de méiose chez les eucaryotes supérieurs. Les trois classes de petits ARN interférants, les piARN, les miARN et les siARN, et leurs protéines Argonautes associées, semblent chacune jouer un rôle important, à différents niveaux.

Ainsi, les protéines PIWI et les piARN jouent un rôle crucial dans le développement des cellules germinales mâles et femelles chez la drosophile, le xénope et le poisson zèbre, et des gamètes mâles chez la souris et le nématode. Chez la drosophile, des mutations dans les gènes codant pour les protéines Piwi ou Aubergine conduisent à la stérilité (Lin and Spradling, 1997 ; Cox et al., 1998), et la protéine Ago3 est également requise pour la fertilité des femelles (Li et al., 2009). Cette stérilité serait liée à des anomalies dans les divisions asymétriques des cellules souches germinales essentielles au renouvellement de ces cellules et à la génération des gonades (Lin and Spradling, 1997 ; Cox et al., 1998). La stérilité a également été imputée à des défauts de ségrégation des chromosomes (Blumenstiel et al., 2008), et à l'activation des transposons qui provoquerait, entre autres, des cassures doubles brins de l'ADN (Klattenhoff et al., 2007). Par ailleurs, les piARN et la protéine Xiwi chez *Xenopus laevis*, et Zili chez le poisson zèbre, sont requis pour la méiose et la formation des gamètes (Lau et al., 2009 ; Houwing et al., 2008). Chez la souris, les piARN ont été séparés en deux classes en fonction de leur origine (séquence répétée ou non), des protéines Piwi auxquelles ils s'associent, et de l'étape de la méiose durant laquelle leur expression est détectée. La première classe est issue de séquences répétées et de transposons, s'associe aux protéines Mili et Miwi2, et s'exprime avant le déclenchement de la méiose I. La délétion des protéines Mili et Miwi2 cause la stérilité des mâles, faisant suite à un arrêt précoce de la méiose I et à l'activation des transposons liée à la perte de la méthylation de leur ADN (Kuramochi-Miyagawa et al., 2004 ; Carmell et al., 2007 ; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008).

La deuxième classe de piARN est issue de séquences non répétées, s'associe à la protéine Miwi, et apparaît plus tardivement dans la méiose, au stade pachytène de la prophase I (Girard et al., 2006 ; Aravin et al., 2006). Des mutations de la protéine Miwi résultent en un arrêt de la spermatogénèse suivant la méiose II, causant la stérilité des mâles (Deng and Lin, 2002). Bien que les piARN s'expriment aussi dans les ovocytes murins, la délétion des protéines Piwi n'impacterait pas l'ovogénèse (Suh and Blelloch, 2011). Enfin, la protéine Piwi PRG-1 est requise pour la spermatogénèse chez *C. elegans* (Wang and Reinke, 2008).

Les miARN jouent également un rôle important dans la gamétogénèse chez les mammifères mâles (Hayashi et al., 2008). Par ailleurs, la présence de Dicer (qui permet la synthèse des miARN et des siARN) est requise pour la spermatogénèse à la fois dans les cellules germinales, et dans les cellules de Sertoli, des cellules somatiques indispensables à la différenciation des gamètes mâles (Hayashi et al., 2008 ; Maatouk et al., 2008 ; Papaioannou et al., 2009 ; Kim et al., 2010). Dicer pourrait être impliquée dans la ségrégation des chromosomes lors de la méiose I de par son association avec l'hétérochromatine des péri-centromères (Khalil and Driscoll, 2010).

Chez les mammifères femelles, ce seraient plutôt les siARN endogènes qui seraient impliqués dans l'ovogénèse, processus dans lequel Dicer est aussi essentiel (Murchison et al., 2007 ; Liu et al., 2010), alors que les miARN ne joueraient pas de rôle (Suh et al., 2010 ; Ma et al., 2010). Ainsi, la perte de la protéine Argonaute Ago2 qui s'associe spécifiquement aux endo-siARN, et de Dicer, provoque un arrêt précoce de la méiose et d'importants défauts de ségrégation des chromosomes (Murchison et al., 2007 ; Kaneda et al., 2009). En plus des piARN, les endo-siARN ont aussi été impliqués dans la spermatogénèse chez *C. elegans*. En effet, plusieurs travaux révèlent l'importance de la classe des petits ARNnc de type 26G (de 26nts de long et une guanine à l'extrémité 5'), des protéines Argonaute AGL-3 et AGL-4, de Dicer et de la protéine RdRP RRF-3 (Han et al., 2009 ; Pavelec et al., 2009 ; Gent et al., 2009 ; Conine et al., 2010). Enfin, chez le riz (*Oriza sativa*), la protéine argonaute Mel1 exprimée spécifiquement dans les cellules germinales mâles et femelle, est requise pour la mise en place de H3K9me et pour la ségrégation des chromosomes lors de la méiose (Nonomura et al., 2007).

En conclusion, le RNAi est essentiel à la différenciation sexuelle. Il met en jeu des mécanismes de régulation à différents niveaux, pour lesquels les modes d'action détaillés restent à élucider.

-Problématique et objectifs-

Lorsque j'ai débuté mon travail de thèse, l'action directe du RNAi sur la structure et la fonction de la chromatine chez *S. pombe* avait été clairement mise en évidence sur les séquences d'ADN non codantes des régions d'hétérochromatine constitutive (voir les Chapitres I et II). Par contre, l'implication du RNAi dans la régulation de l'expression de gènes codants n'était pas connue. Ago1 et H3K9me venaient d'être identifiés comme étant spécifiquement associées à la chromatine de deux gènes de la différenciation sexuelle, *mei4* et *ssm4* (Cam et al., 2005). Ce résultat suggérait pour la première fois que le RNAi pourrait réguler des gènes codants, et que le rôle joué par le RNAi dans la régulation de la différenciation sexuelle pourrait passer par l'établissement d'un « silencing » épigénétique de gènes de la différenciation sexuelle.

Mon travail de thèse avait pour objectif de caractériser le rôle du RNAi dans la différenciation sexuelle chez *S. pombe*. Pour cela, j'ai cherché à définir l'implication du RNAi dans la régulation des gènes méiotiques en suivant trois objectifs :

i) J'ai caractérisé dans un premier temps le recrutement de RITS sur les deux gènes méiotiques *mei4* et *ssm4*, révélant ainsi l'importance de la protéine Mmi1 dans le ciblage de ces gènes.

ii) Nous avons dans un second temps mis en place une stratégie afin d'identifier de nouveaux gènes cibles du RNAi, en utilisant la connexion que nous avons mise en évidence entre le RNAi et Mmi1.

iii) Enfin, nous avons analysé les conséquences du recrutement du RNAi sur l'expression de ces gènes.

-Matériels et méthodes-

1. Matériel biologique et conditions de culture

1.1. Souches utilisées

Les souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau suivant (Table 2). Dans la dernière colonne de ce tableau intitulée « provenance », est indiqué, le cas échéant, le nom du directeur du laboratoire d'où provient la souche concernée. Dans le cas où la souche a été construite au laboratoire, le nom du plasmide (voir la Table 3, paragraphe 1.3.3.), ou de la souche dont l'ADN génomique ont été utilisés pour construire la souche en question, est alors indiqué dans la colonne « provenance ». Toutes les souches construites pour cette étude ont été obtenues en suivant le protocole classique de transformation de levure par recombinaison homologe (voir le paragraphe 2. de cette partie).

Table2. Génotype des souches utilisées.

Souche	Génotype	Provenance
SPV8	<i>h+ leu1-32 ade6-216 ura4D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1</i>	D. Moazed
SPV13	<i>h+ leu1-32 ade6-216 ura4-D18imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan</i>	D. Moazed
SPV41	<i>h-</i>	D. Moazed
SPV47	<i>h- leu1-32 ade 6-M210 ura4-D18 his 3-Dr</i>	D. Moazed
SPV72	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 tas3-TAP-kan</i>	D. Moazed
SPV77	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 chp1-13 myc - Kan</i>	D. Moazed
SPV119	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 lmr::ura4+ chp1-TAP-kanΔrdp1 ::nat</i>	D. Moazed
SPV131	<i>h+ leu-1-32 ade6-216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan Δclr4::nat</i>	D. Moazed
SPV171	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 lmr::ura4+ chp1-TAP-kan Δago1::hph</i>	D. Moazed
SPV176	<i>h+ leu-1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 tas3-TAP-hph Δdcr1::nat</i>	D. Moazed
SPV203	<i>h+ leu-1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 chp1-TAP-hph Δdcr1::nat</i>	D. Moazed
SPV214	<i>h+ leu-1-32 ade6-216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 he11-TAP-hph Δdcr1::kan</i>	D. Moazed
SPV341	<i>h- ura4-5 Box B - hph tas3-λN – kan Δago1 ::nat</i>	D. Moazed
SPV388	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan</i>	D. Moazed
SPV413	<i>h+ leu-1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(NcoI)::ura4+ ori1 chp1-TAP-hph Δtas3::nat</i>	D. Moazed

Souche	Génotype	Provenance
SPV481	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp-:TAP-kan mei4 Δ(nts828 à 1554)::gfp-hph</i>	PAN45
SPV484	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan mei4 Δ(nts489 à 1554)::gfp-hph</i>	PAN45
SPV530	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4DS/E imr1R(Ncol)::ura4+ ::kan-pnmt41-TAP-mmi1</i>	PAV10
SPV 545	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ::kan-p3nmt1-TAP-mmi1</i>	PAV11
SPV903	<i>h+ leu1-32 ori1 ade 6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ chp1- TAP-kan mei4Δ(nts828 à 1554) :: gfp-hph Δmmi1::nat</i>	PAN27
SPV912	<i>h- ura4- 5 Box B - hph</i>	D. Moazed
SPV913	<i>h- ura4-5 Box B - hph tas3-λN - kan</i>	D. Moazed
SPV914	<i>h- ura4-5 Box B - hph Δleu 1 :: λN - gfp - nat</i>	D. Moazed
SPV916	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-gfp-hph</i>	PAN103
SPV920	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-DSRmei4-hph</i>	PAN102
SPV932	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan nat-p3nmt1-mei4</i>	PAN6
SPV948	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan ΔDSRmei4 :: ura4</i>	PAN36
SPV951	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan ΔDSRmei4(nts489 à 828) :: ura4 + Δura4 :: mei4 5' 3 = délétion propre DSR de mei4</i>	Voir §2
SPV954	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ kan-p3nmt1-TAP-Mmi1 Δclr4::hph</i>	PAN28
SPV980	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-DSRmei4 -hph + Δmmi1 :: nat</i>	PAN27
SPV986	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-DSRmei4 -hph + Δclr4 :: nat</i>	ADN SPV131
SPV998	<i>h- Δura4 :: gfp-DSRmei4 - hph</i>	PAN12
SPV1004	<i>h- Δura4 :: gfp-DSRmei4 - hphΔclr4 :: nat</i>	ADN SPV131
SPV1007	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-DSRmei4 -hph + Δago1 :: nat</i>	ADN SPV341
SPV1022	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his6 chp1-TAP-kan Δmei4 :: ura4Stop-DSRmei4 -hph + Δdcr1 :: nat</i>	ADN SPV203
SPV1038	<i>h- ura4+ :: 5Box B -hphnat- p3nmt1-λN-mmi1</i>	PAN13
SPV1114	<i>h- ura4+ :: 5Box B -hphnat- p3nmt1-λN-mmi1Δdcr1::kan</i>	ADN SPV214
SPV1117	<i>h- ura4+ :: 5Box B -hphnat- p3nmt1-λN-mmi1Δclr4::kan</i>	ADN PAN101
SPV1199	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan Δpromoteur mei4(nts-307à -7 de l'ATG) ::hph</i>	PAN28
SPV1210	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18Imr:: ura4+ chp1-TAP-kanΔ5'mei4(nts 1 à 488) :: nat-pnmt41-gfp</i>	PAN34
SPV1309	<i>Δura4 :: nat-p3nmt1-gfp-DSRmei4</i>	PAN96
SPV1332	<i>Δura4 :: nat-p3nmt1-gfp-DSRmei4Δclr4 ::hph</i>	PAN28
SPV1392	<i>h- ura4+ :: 5BoxB- hph chp1-λN-kan</i>	PAN8
SPV1395	<i>h- ura4+ :: 5BoxB- hphnat - p3nmt-λN-ago1</i>	PAN13
SPV1419	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 lmr:: ura4+ nat-pnmt41-gfp-mei4</i>	PAN34
SPV1524	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 lmr:: ura4+ chp1-TAP-kan Δmei4(nts 1552 à 1554) ::gfp-hph</i>	PAN45
SPV1529	<i>h+ leu1-32 ori1 ade6-M216 ura4-D18 lmr:: ura4+ chp1-TAP-kan Δmei4(nts 388 à 1554) ::gfp- hph</i>	PAN45

Souche	Génotype	Provenance
SPV1614	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-hph Δdcr1::hph</i>	ADN SPV886
SPV1739	<i>h+ leu1-32 ade6-216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan Δclr4::nat</i>	ADN SPV131
SPV1742	<i>h+ leu1-32 ade6-216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan Δrdp1::nat</i>	ADN SPV119
SPV1785	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 mei4 Δ(nts 828 à 1554) ::gfp-hph</i>	PAN45
SPV1817	<i>h+ leu1-32 ade6-M216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 mei4 Δ(nts 828 à 1554) ::gfp-hph Δmmi1 ::nat</i>	ADN SPV903
SPV1829	<i>h- ura4+ ::5Box B -hphnat- p3nmt1-λN-mmi1 chp1-13myc-kan</i>	ADN SPV77
SPV1832	<i>h- Δura4 ::gfp-DSRmei4 -hph chp1-13myc-kan</i>	ADN SPV77
SPV1889	<i>h+ leu1-32 ade6-216 ura4-D18 imr1R(Ncol)::ura4+ ori1 chp1-TAP-kan Δago1::hph</i>	ADN SPV171
SPV1965	<i>h- Δura4 ::gfp-nat chp1-13myc-kan</i>	ADN SPV77
SPV2011	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr Δmei4 :: ura4 sans stop -gfp-hph</i>	PAN98
SPV2012	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr chp1-TAP-kan-Δmei4 :: ura4 sans stop-DSRmei4-hph</i>	PAN97
SPV2068	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr chp1-TAP-kan-Δmei4 :: ura4 sans stop-DSRmei4-hph Δago1::nat</i>	ADN SPV341
SPV2077	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr chp1-TAP-kan-Δmei4 :: ura4 sans stop-DSRmei4-hph Δmmi1::nat</i>	ADN SPV903
SPV2089	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr-Δmei4 :: ura4 sans stop-DSRmei4-hph</i>	PAN97
SPV2092	<i>h- leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his 3-Dr chp1-TAP-kan-Δmei4 :: ura4 sans stop-gfp-hph</i>	PAN98
SPV2095	<i>h- ura4- 5BoxB - hphΔleu1::mmi1-λN-kan</i>	PAN100

Note : Tous les mutants présentant un génotype *Δmmi1* expriment également une version inactivée de *Mei4*, consistant en la délétion soit d'une partie de la séquence codante du gène *mei4* (SPV903 et 1817), soit de l'ensemble de la CDS de *mei4* (SPV980 et 2077). En effet l'inactivation de *Mmi1* conduit à l'expression du gène *mei4*, toxique pour les cellules haploïdes (pour plus de détails, voir le paragraphe 3.2.3.1 de l'introduction page 76).

1.2. Conditions de culture des levures

En règle générale, les levures sont cultivées à 32°C, et sous agitation à 220rpm lorsqu'il s'agit de cultures liquides. La composition des milieux utilisés est décrite ci-dessous.

1.2.1. Milieux riches

YES liquide (Yeast Extract Supplemented) : 5g/l extrait de levure (Becton Dickinson, BD) ; 30g/l dextrose (BD) ; 0,225g/l leucine ; 0,225g/l adénine ; 0,225g/l uracile ; 0,225g/l histidine ; 0,225g/l lysine (Sigma).

YEA liquide (Yeast Extract Supplemented with Adenine): 5g/l extrait de levure (BD) ; 30g/l dextrose (BD) ; 0,225g/l adénine (Sigma).

Pour les milieux solides, 20g/l d'agar (Bacto Agar, BD) sont ajoutés avant autoclavage. Tous ces milieux sont autoclavés 20 min à 120°C. Les milieux sélectifs contiennent 100 à 200µg/ml d'antibiotique (Hygromycine B, Roche ; Généticine G418, Roche ; Nourséothricine ClonNAT, Werner BioAgents) ou 1g/l d'acide 5-fluoro-orotique (5FoA ; Toronto Research Chemicals) ajouté au milieu, après autoclavage.

1.2.2. Milieux minimum

Emm (Edinburgh Minimum Medium) : 12,35g/l Emm sans dextrose (Q-Bio gene) ; 20g/l dextrose.

Emmc (Edinburgh Minimum Medium complete):12,35g/l Emm sans dextrose (Q-Bio gene) ; 20g/l dextrose; 0,225g/l leucine ; 0,225g/l adénine ; 0,225g/l uracile ; 0,225g/l histidine ; 0,225g/l lysine (Sigma).

PMGc (Pombe Medium Glutamate complete): 27,14g/l d'Emm sans azote (Emm No N; MP Biomedicals) contenant 20g/l dextrose; 3,75g/l acide glutamique (Sigma); 0,225g/l leucine ; 0,225g/l adénine ; 0,225g/l uracile ; 0,225g/l histidine ; 0,225g/l lysine (Sigma).

SPAS (S. Pombe sporulation) : 27,14g/l d'Emm sans azote (Emm No N; MP Biomedicals) contenant 10g/l dextrose; 1g/l potassium phosphate (Sigma); 45mg/l leucine ; 45mg/l adénine ; 45mg/l uracile ; 45mg/l histidine ; 45mg/l lysine (Sigma).

Pour les milieux solides, 20g d'agar (Bacto Agar, BD) dilués dans 500ml d'eau sont autoclavés séparément, puis ajoutés à 500ml du milieu synthétique concentré 2 fois et préalablement stérilisé par filtration (filtres à pores de 0,22µm de diamètre). Cette manière de procéder permet de limiter la dégradation des vitamines du milieu induite par l'autoclavage.

1.3. Description des plasmides utilisés

1.3.1. Protocole de clonage bactérien

Les plasmides utilisés dans cette étude ont été obtenus en suivant le protocole de clonage bactérien classique. Les cassettes d'ADN à insérer dans les plasmides receveurs sont obtenues suite à la digestion par des enzymes de restriction (2 unités par μg d'ADN ; New England Biolabs NEB), soit d'un plasmide donneur, soit d'un produit PCR (voir le paragraphe 2.2. et la Table 5 pour le détail des réactions PCR). Ces produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, extraits du gel, et ligaturés par la ligase d'ADN T4 (NEB) dans le plasmide receveur préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé par une ADN phosphatase (Antartic Phosphatase, NEB). 50 à 100ng du produit de ligature sont utilisés pour transformer des bactéries DH5 α thermo-compétentes produites au laboratoire (25 μl de bactéries par transformation). Les bactéries sont mélangées à l'ADN à transformer, et le choc thermique se fait à 42°C, pendant 90sec. Les bactéries sont étalées sur du milieu de type Luria Broth (LB) contenant 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline. Les clones ayant intégré le plasmide sont sélectionnés par PCR sur colonies. L'ADN plasmidique est extrait à l'aide d'un kit d'extraction (Miniprep Macherey Nagel). La quantité obtenue est estimée par mesure de la DO₂₆₀, et la qualité du plasmide est vérifiée grâce à une digestion suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose. La migration se fait à 100V dans du tampon TAE 1X, dans un gel contenant 1 à 1,8% (p/v) d'agarose et 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromure d'éthidium (BET) et l'ADN est visualisé sous lumière ultra-violette. Afin de vérifier l'absence de mutations pouvant se produire lors des étapes de PCR ou de transformation bactériennes, le plasmide est ensuite envoyé à séquencer (Beckman Coulter Genomics).

1.3.2. Mutagénèse dirigée

Pour l'obtention du plasmide PAN100 (voir paragraphe 1.3.3,) une étape de mutagénèse sur le plasmide PAN99 a été nécessaire, afin d'éliminer un codon stop présent entre la séquence codant pour Mmi1 et l'étiquette λN , et le remplacer par une séquence de liaison constituée de la suite d'acides aminés Proline-Proline-Leucine. Cette séquence de

liaison ajoutée est la même que celle utilisée par M. Bühler lors de la construction de la souche SPV913 exprimant Tas3-λN (Buhler et al., 2006).

La mutagénèse dirigée a été réalisée à l'aide du kit QuickChange II XL(Stratagene) et des amorces PV1268 et PV 1269 (voir la Table 4).

1.3.3. Liste des plasmides et des amorces nucléotidiques

Le tableau ci-dessous (Table 3) dresse la liste des plasmides utilisés, avec leur description et leur provenance. Dans le cas des plasmides construits spécifiquement pour cette étude, sont indiqués dans la colonne de droite « construction », dans l'ordre : le nom des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de la cassette d'ADN à cloner, ainsi que le nom de la souche dont l'ADN génomique a servi de matrice pour la PCR, les enzymes de restriction utilisées, et le plasmide receveur.

Table 3. Liste des plasmides utilisés.

Plasmide	Description	Provenance	Construction
PAN6	pFA6a natMX6 p3nmt1	Euroscarf	
PAN8	pFA6a λN kanMX6	Euroscarf	
PAN10	pFA6a GFP(S65T) sans stop KanMx6	Laboratoire	
PAN12	pFA6a-GFP(S65T) sans stop-DSRmei4-KanMX6	Cette étude	PV215/216; SPV8; Asc1/Asc1; PAN10
PAN13	pFA6a natMX6 p3nmt1 λN	Cette étude	PV246/247; Pac1/Asc1; PAN14
PAN14	Pfa6 natMX6 p3nmt1 GFP	Euroscarf	
PAN27	pfa6a-natMX6	Euroscarf	
PAN28	pfa6a-hph	Euroscarf	
PAN34	pFA6a natMX6 P41nmt1 GFP	Euroscarf	
PAN36	pBluescript SK(+) ura4	JP. Javerzat	
PAN39	pfa6a DSRmei4 hph	Cette étude	PV144/145; SPV13 ; Pac1/Asc1; PAN45
PAN45	pFA6a GFP(S65T) hph	J. Bähler	
PAN46	pFA6a GFP(S65T) natMX6	J. Bähler	
PAN96	pfa6a natMX6-p3nmt1-GFP-DSRmei4	Cette étude	
PAN97	pfa6a ura4-sans-stop DSRmei4 hph	Cette étude	PV1241/487 ; PAN36 ; BamH1/Pac1 ; PAN39
PAN98	pfa6a ura4-sans-stop GFP hph	Cette étude	PV1241/487 ; PAN36 ; BamH1/Pac1 ; PAN45
PAN99	pfa6 mmi1 Stop λN KanMX6	Cette étude	PV1244/1245; SPV8; Sal1 / BamH1; PAN8
PAN100	pfa6 mmi1-Pro Pro Leu linker-λN KanMX6	Cette étude	PV1268/1269; PAN99
PAN101	pfa6-kanMX6	I. Hagan	

Plasmide	Description	Provenance	Construction
PAN102	pfa6a ura4-stop DSRmei4 hph	Cette étude	PV153/154; SPV8; Pac1; PAN39
PAN103	pfa6a ura4-stop GFP hph	Cette étude	PV153/154; SPV8; Pac1; PAN45
PAV10	pfa6 kanMX6 p3nmt1 TAP	J. Bähler	
PAV11	pfa6 kanMX6 p3nmt1 TAP	J. Bähler	

Le tableau présenté ci-dessous (Table 4) répertorie toutes les amorces utilisées dans cette étude, ainsi que leur séquence nucléotidique (dans le sens 5' -> 3').

Table 4 Liste des amorces utilisées

Amorce	Séquence 5'-3'
AV151	TTCGACAACAGGATTACGACC
PV60	GAAATAGAAGCAAGACAATCGG
PV61	CAATGTTCTAGAAGTGATTCAGAG
PV74	CCGAATGTGATCGACCAAGTTCG
PV75	CGTGTATTCCATGGCCAAGCGTTC
PV114	GTTCAATCAAACATCAAGTTCAG
PV115	GGACGTAGTGGTATGGGTTCCCTACG
PV150	TCCACAGCACTCAACAACAGTCTTGGA
PV151	TCGATTCCAAGTACATGGAGAGCG
PV174	TACCCATTGAGCACGGTAT
PV175	CTTCTCACGGTTGGATTTGG
PV176	GTACTGGCCCATACCGTGAT
PV177	CGAATGGAAGACGAGAAAAGC
PV180	AAAAGCGACCTTCAAGCAA
PV181	TTGCATCGTTTGAGACTTCG
PV182	TGCAAGAGGAAACTCAAAGG
PV183	TTCCTCCTCCACTGTTTTGA
PV201	TCTTGATAACACAGACATAGGGTCC
PV209	TACCTTTGGGACGTGGTCTC
PV210	CCCGTCTCCTTAAACATCCA
PV256	GGATACCGAGACGCAGGATA
PV257	TGGCTTGTTGTACGTTGTTCA
PV293	ATGGATGCTAGAGTATTTCAAAGC
PV336	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTA
PV337	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTC
PV338	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTG
PV339	AACAGCAAATCCGAGAAAGAGG
PV340	GCAGAACCATTTGTGGGCAAAG
PV342	GGCATACTTCTTCGTTTGGG
PV345	ACAATCAAGATGTTCTTACAAAGG
PV346	CAACATGTAGATCCACAGAAGG
PV368	GTCTTCTCCTTCTCGTGATCC
PV369	GTAGGCACAGTCGCTGAAGG
PV497	AGGCCGACGGAAATTTTATG

Amorce	Séquence 5'-3'
PV498	TCGTGAAACCGATTTGAGTG
PV792	TTTGCTCGTATGCAAGATCG
PV793	TATTCACGAGCACGCCATAA
PV794	GTTGAAGTTGGACGGGATGT
PV795	TTCTACCCTACTCGGCATCG
PV818	GAAACGGCTGGCTATTTCAA
PV819	ATGGGCGTACAGGAAGAAGA
PV995	TTGCGAATGCAAATTGTAGC
PV996	AAGCCAACCGTGTTATTCGT
PV997	ACTGCAAAAAGCGCTCCTAA
PV998	GGTACCAATATGCGCTGGTC
PV999	GATACCCTGGAAACGGAAAA
PV1000	AAGCGGTTTCATCAGCATACC
PV1097	GGCTGACCAAATGAATGCTT
PV1098	GATCTGCCCAACCAACAATC
PV1103	CTCTGTTGGCTCCTTCAAGC
PV1104	TAATGTTTGAGCACGCATGG
PV1111	ACAGCTAAAGACCGCAAGGA
PV1112	CAATGGGCTTGGAATTGAGT
PV1150	TGCCCATGAGTCTAGCCTT
PV1151	TGGCTATTAGAGCGAAAGGAA
PV1216	CGAAAGATCCCAACGAAAAG
PV1217	CAGTTGAGTGCGAACGATGT
PV1218	GCTGGGACAGCAATATCGTA
PV1219	TATGCCTTCCAACCAGCTTC
PV1242	TGGAAGCGTTCAACTAGCAG
PV1243	CCCAGCAGCTGTTACAAACTC
PV1264	AAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGA
PV1268	GAATTGGAAGAGACCGTCCACCGCTCATGGACGCACAAACACG
PV1269	CGTGTTTGTGCGTCCATGAGCGGTGGACGGTCTCTTCCAATTC
PV1363	TGCTTTGCCAAGGTCAAAAT
PV1364	AAGGCACATGGGAACCATT
PV1369	TCGCCCTTTTTAAACAAACC
PV1370	ACTTGGTGCGATTTGTAGGG

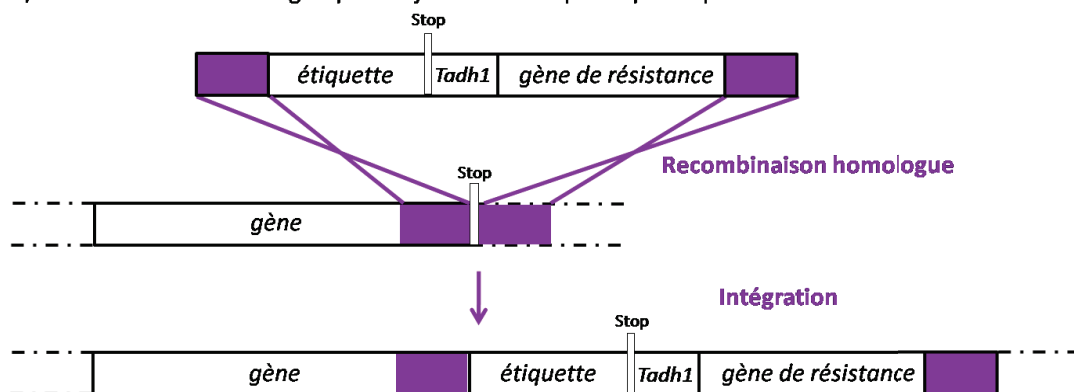
2. Construction de souches par transformation et recombinaison homologue

Les souches nécessaires ont été construites en utilisant la méthode classique d'amplification par PCR d'une cassette d'ADN permettant la recombinaison homologue au site génomique accepteur, suivie d'une transformation par choc thermique en présence d'acétate de lithium (Bahler et al., 1998).

2.1. Stratégie d'introduction d'une séquence d'ADN

L'introduction d'une séquence d'ADN dans le génome de *S. pombe* est réalisée par recombinaison homologue. La cassette d'ADN contenant un gène de résistance (avec son promoteur et son terminateur) qui servira à la sélection des transformants, et selon les cas la modification que l'on veut apporter au gène sauvage (étiquette protéique *gfp*, TAP, 13myc etc.) associée au terminateur du gène *adh1* (annoté *Tadh1*) de *S. cerevisiae* (Wach et al., 1997) est amplifiée grâce à des réactions PCR. La recombinaison homologue avec la région acceptrice sauvage est permise par la présence, de part et d'autre de cette cassette d'ADN à insérer, de 80 à 200 paires de bases (pb) homologues à la région génomique encadrant précisément le site d'insertion (Figure 30). Cette cassette est alors introduite dans les cellules de *S. pombe* par la méthode classique de transformation par choc thermique. Les transformants positifs sont ensuite sélectionnés sur un milieu contenant l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par la cassette d'ADN.

A/ Recombinaison homologue pour l'ajout d'une étiquette protéique en C-Ter.



B/ Recombinaison homologue pour une délétion totale de la CDS d'un gène.

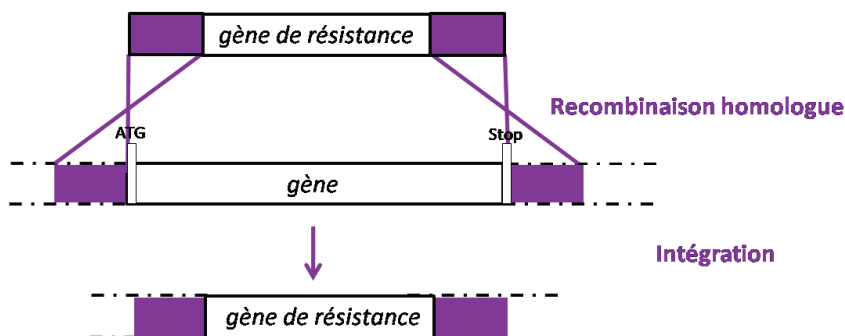


Figure 30. La recombinaison homologue : une étape cruciale du processus de transformation de cellules de *S. pombe*. A/ Fusion d'une étiquette protéique du côté C-Ter du produit du gène. Lors de

la recombinaison, le codon Stop du gène cible est remplacé par la cassette d'ADN recombinant constituée d'une étiquette et d'un gène de résistance. **B/** Elimination de la totalité de la séquence codante (CDS) d'un gène. Lors de la recombinaison, la totalité de la CDS du gène est remplacée par un gène de résistance. Voir le texte pour plus de détails.

2.2. Amplification par PCR

De manière classique, 10 réactions de PCR d'un volume final de 50µl (selon la Table 5) sont réalisées, soit à partir d'ADN génomique (ADNg) de levure, soit à partir d'un plasmide bactérien, de manière à amplifier la cassette d'ADN à insérer. Dans le cas d'une amplification à partir d'ADN génomique, on utilise une amorce sens et une amorce antisens, situées chacune à 200pb de la cassette contenant le gène de résistance : le produit PCR comportera alors 200pb homologues au site accepteur de part et d'autre de la cassette. Dans le cas d'une amplification à partir d'un plasmide, les régions homologues sont apportées grâce aux amorces. Ces amorces spécifiques contiennent 20nts homologues au plasmide, et 80nts homologues au site génomique accepteur.

Dans certains cas, une ADN polymérase « haute fidélité » doit être utilisée, afin de limiter le risque de mutations dans la cassette d'ADN à amplifier (Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Finnzyme). La PCR est alors réalisée dans les conditions préconisées par le fournisseur. La qualité des amplicons (taille et quantité) est vérifiée par une électrophorèse sur un échantillon des produits de la PCR. Le produit de la PCR est visualisé sous lumière ultra-violette après électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET). La migration se fait à 100V dans du tampon TAE 1X, dans un gel d'agarose 1 à 1,8% (p/v), 0,5µg/ml de BET. Le produit PCR peut également être soumis à un séquençage (Beckman Coulter Genomics).

La table suivante (Table 5) renseigne la composition des différentes réactions PCR réalisées dans cette étude, dans les différents protocoles décrits dans la suite de cette partie.

Table 5. Composition des différentes réactions de PCR

Composant	PCR cassette	PCR radioactive	PCR après RT
Tampon 10X Invitrogen	1X	1X	1X
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM
Mélange de dNTP (10mM de chaque)	0,2mM	0,2mM	0,4mM
PlatinumTaqPolymerase (Invitrogen)	0,04U/μL	0,05U/μL	0,04U/μL
Amorce 1 (50μM)	1μM	1μM	0,5μM
Amorce 2 (50μM)	1μM	1μM	0,5μM
Amorce Contrôle 1 (50μM)	-	1μM	-
Amorce Contrôle 2 (50μM)	-	1μM	-
[α- ³² P] dCTP (3000mCi/mmol, 10μCi/μL)	-	0,12μCi	-

2.3. Purification des fragments PCR

Un volume de phénol-chloroforme-isoamylalcool (25-24-1 ; pH8) est ajouté aux échantillons non utilisés pour l'électrophorèse de vérification (§2-2), l'ensemble est vortexé pendant 4-5sec puis centrifugé 2min à 16000g. La phase aqueuse supérieure est récupérée, lavée avec un volume de chloroforme, puis 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M à pH5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100% lui sont ajoutés. La précipitation de l'ADN est réalisée à -80°C pendant 15min (ou à -20°C au moins 1h). Les culots, obtenus après une centrifugation de 15min à 16000g à 4°C, sont lavés avec 1ml d'éthanol 75%, puis séchés. L'ADN précipité est ensuite remis en suspension dans 20μl d'eau distillée. La concentration de l'ADN est estimée en mesurant la DO₂₆₀.

2.4. Transformation de *S. pombe*

Une culture de 50ml de cellules de *S. pombe* d'une DO₆₀₀ entre 0,2 à 0,5 est centrifugée 5min à 800g à température ambiante. Les cellules sont lavées dans un premier temps avec 10ml d'eau distillée stérile, puis avec 1ml de tampon LiOAc (Tampon TE 1X à pH7,5 ; Acétate de lithium (LiOAc) 0,1M pH7,0). Les cellules sont remises en suspension dans 250μl de tampon LiOAc. L'ADN transformant (30 à 40μg) est mélangé avec 2μg d'ADN de sperme de saumon préalablement fragmenté par sonication et dénaturé par chauffage à 100°C. 100μl de cellules sont ajoutées à ce mélange d'ADN puis laissées à température ambiante pendant 10min. Le tampon PEG (260μl Tampon TE 1X pH7,5 ; LiOAc 0,1M pH7,0 ;

PEG 4000 40% (p/v)) et ajouté aux cellules en prenant soin de bien homogénéiser. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 30 à 60min. 43µl de DMSO sont ajoutés aux cellules et mélangé en vortexant 2sec. Un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 5min. Les cellules sont ensuite centrifugées 1min à 1800g et lavées une fois avec 1ml d'eau distillée puis remises en suspension dans 500µl d'eau. Les cellules sont étalées sur une boîte de milieu YEA et incubées à 32°C pendant 24h avant d'être répliquées sur des boîtes YEA contenant l'agent de sélection et incubées à 32°C 2 à 3 jours. Des clones sont alors prélevés et isolés, par stries sur milieux sélectifs.

2.5. Sélection des transformants positifs

La sélection des clones positifs est réalisée par PCR. Celles-ci se font dans un volume final de 20µl à partir d'une fraction d'une colonie ayant poussé sur milieu sélectif. Les cellules prélevées sont ensuite lysées par micro-ondes pendant 3min afin de libérer l'ADN cellulaire, avant de déposer le mélange des réactifs pour la réaction PCR. Une dizaine de colonies sont testées pour vérifier i) la bonne intégration de la cassette et ii) l'absence du gène sauvage. Les transformants identifiés comme positif par PCR peuvent être ensuite vérifiés par Western-blot dans le cas de l'insertion d'une étiquette.

3. Western blot

Les Western blots pour la détection de protéines spécifiques sont effectués selon la technique classique consistant à séparer les protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis à les transférer sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines sont alors détectées à l'aide d'anticorps spécifiques.

Les protéines sont extraites à partir d'une culture saturée ($DO_{600} > 8$) réalisée dans 4ml de YEA liquide, incubée à 32°C pendant 12 à 16h.

Les cellules sont lavées dans 1mL d'eau, et remises en suspension dans 250µl de tampon de lyse froid (50mM Hepes-KOH à pH 7,5; 150mM NaCl ; 20mM MgCl₂; 10% v/v

glycérol ; 1mM EGTA ; 1mM EDTA; 0.1% NP40; 1mM sodium fluoride ; 1mM PMSF; 1mM Benzamidine; 1µg/ml Leupeptine; 1µg/ml Bestatine; 1µg/ml Pepstatine ; 1µg/ml Aprotinine ; 0,5mM Na-Orthovanadate ; 20mM β-glycérophosphate). 100µl de billes de verre (0,5mm diamètre, Biospec) sont ajoutées, et les cellules sont lysées 2 fois 30sec dans un« mini Bead-beater » avec une pause de 2min dans la glace.

La quantité de protéines totales extraites est estimée par dosage de Bradford (Biorad). Les protéines totales (1 à 3µg) sont alors dénaturées par chauffage 5min à 65°C dans du tampon de charge (Tampon 5X : 25% glycérol ; 312mM Tris-HClpH6,8 ; 10% SDS ; 25% βmercaptoéthanol ; 100mM DTT ; 0,05% bleu de bromophénol). Une centrifugation rapide à 16000g permet l'élimination des débris cellulaires.

L'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide 6 à 10% (selon le poids moléculaire des protéines d'intérêt), dans du tampon de migration TGS 1X (TGS 10X : 30,25g/l Tris ; 144g/l glycine ; 10g/l SDS). Les protéines sont alors transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham) par électrotransfert liquide dans du TGS 0,5X contenant 20% d'éthanol. Après saturation de la membrane dans du TBS 1X (Tris Buffered Saline : 20mM Tris-HCl pH7,6; 150mM NaCl) contenant 0,1% Tween20 et 5% (p/v) de lait de vache en poudre (12 à 16h à 4°C), la membrane est incubée 1h à température ambiante avec une dilution d'anticorps primaire (provenant d'une souris ou d'un lapin) reconnaissant de manière spécifique soit l'étiquette fusionnée à la protéine d'intérêt, soit la protéine directement (voir le détail ci-dessous). La membrane est alors lavée trois fois 5 à 10min dans du TBS-Tween20 0,1%, puis à nouveau incubée 1h à température ambiante avec une dilution 1/5000 d'anticorps secondaire (Dako) reconnaissant les IgG produit chez la souris ou le lapin, couplé à la l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase), dans du TBS ou du PBS 1X pH7,4 (137mMNaCl ; 2,7mM KCL ; 8mM Na₂HPO₄ ; 2mM KH₂Po₄ ; Invitrogen) contenant 0,1% Tween20 et 1% de lait. L'activité enzymatique HRP est révélée par l'utilisation d'un kit ECL (Amersham) qui permet de générer un signal lumineux détectable par exposition à des films autoradiographiques (Amersham)

Dilutions pour les anticorps primaires :

i) Dans 5ml de TBS1X contenant 0,1% tween et 1% de lait :

- Détection de l'étiquette GFP : dilution 1/1000 de l'anti-GFP (souris ; Roche ; réf11814460).
- Détection de la protéine Tub1 : dilution 1/5000 de l'anti-Tub1 (souris).
- Détection de l'étiquette TAP : dilution 1/5000 de l'anti-TAP (lapin).

ii) Dans 5ml de PBS 1X avec 0,2% Tween20 et 10% de sérum de veau foetal : Détection de la protéine Mmi1 avec une dilution 1/5000 de l'anti-Mmi1 (lapin ; Eurogentec ; réf. 556 ; 0,24mg/ml).

4. Extraction d'ARN totaux

La purification d'ARN s'effectue selon le protocole bien établi de purification en présence de phénol acide. Brièvement :

Les cellules (25ml de culture) en phase exponentielle de croissance (DO_{600} de 0,5) sont centrifugées 2min à 800g à température ambiante, puis lavées dans 1ml d'eau. Les cellules sont remises en suspension dans 750 μ l de tampon TES (10mM Tris pH7,5 ; 10mM EDTA pH8,0 ; 0,5% SDS), auxquels on ajoute 750 μ l de phénol-chloroforme acide (5-1 ; pH4,5 ; Ambion). L'ensemble est immédiatement vortexé, puis les cellules sont lysées 15min à 65°C, avec 10sec de vortex toutes les 2 ou 3min. Les échantillons sont alors centrifugés 15min à 12000g à 4°C, et subissent une deuxième extraction au phénol acide pour permettre l'extraction des protéines contaminantes, et un lavage au chloroforme. L'ARN ainsi extrait est précipité pendant 12h à -20°C ou 30min à -80°C, avec 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH5,2) et 2,5 volumes d'éthanol pur froid (-20°C). Le culot d'ARN est obtenu par centrifugation pendant 10min à 16000g et 4°C, lavé avec de l'éthanol 70% (v/v), et séché 5min à température ambiante avant d'être remis en suspension dans 500 μ l d'eau libre de toutes traces de RNase. La concentration de l'ARN est estimée en mesurant la DO_{260} et la qualité est contrôlée après migration de 5 μ g d'ARN sur un gel d'agarose 1,1%.

Une partie de l'ADN génomique contaminant est éliminée par une étape de purification supplémentaire. Pour cette purification, 100 μ g d'ARN extrait dans un volume de 100 μ l sont purifiés à l'aide du kit RNEasy de Qiagen selon les recommandations du

fabriquant. Cette étape provoque la perte de manière non linéaire d'une partie des ARN de taille inférieure à 700nts.

5. RT-PCR (Reverse –Transcription PCR)

5.1. Digestion de l'ADN par traitement à la DNase I

Les ARN totaux (1µg) sont traités à la DNase I pendant 30 à 45 min à 37°C (ARN totaux 0,17µg/µl; inhibiteur de RNase (RNaseOut, Invitrogen) 2U/µl; DTT 10mM ; tampon DNase I 5X (100mM Tris pH8 ; 10mM MgCl₂) 1X; DNase I(Roche) 2U/µl). La DNase est ensuite inactivée par ajout de 0,7µl d'EDTA 50mM, et chauffage à 70°C pendant 10min. L'excédent d'EDTA est alors neutralisé par l'ajout de 0,8µl de MgCl₂ 30mM.

5.2. Synthèse d'ADN complémentaire par transcription inverse et PCR

Les ARN traités à la DNase I subissent une étape favorisant l'hybridation avec les amorces nucléotidiques utilisées pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc). Les ARN sont incubés pendant 5min à 65°C avec 1µl du mélange d'amorces spécifiques des ARN à transcrire (2µM chacune), ou avec 1µl d'un mélange à 50ng/µl d'amorces hexamériques non spécifiques (permettant de transcrire tout ARN présent dans l'échantillon) et 1µl de dNTP (10mM de chaque dNTP). Après un refroidissement rapide des échantillons (1min à 4°C), 9µl de la réaction de synthèse d'ADNc (concentrations finales dans l'échantillon : Inhibiteur de RNase 2,2U/µl, tampon RT 5X(Invitrogen) 1X, DTT 10mM, transcriptase inverse SuperScript II Invitrogen 10 U/µl) sont alors ajoutés et le mélange est incubé pour la synthèse des ADNc pendant 50min à 42°C. La transcriptase inverse est inactivée par chauffage à 70°C pendant 15min. Une réaction contrôle est également réalisée en absence de transcriptase inverse afin de vérifier que l'amplification observée lors de l'étape de PCR n'est pas due à la présence d'ADN résiduel la solution d'ARN. Pour ce contrôle, l'enzyme RT est remplacée par de l'eau.

5.3. Analyse des RT par PCR

Les ADNc obtenus sont amplifiés et quantifiés par PCR classique ou par PCR quantitative (qPCR).

Les PCR classiques sont réalisées dans un volume final de 25 μ l à partir de 2 μ l d'ADNc (produit de RT ; Table 5) avec un programme PCR comprenant une première étape de dénaturation à 94°C pendant 2min, puis 20 à 32 cycles de 30 sec à 94°C, 45 sec à 55°C et 1 min à 72°C. Afin de pouvoir quantifier visuellement l'ADN amplifié, la linéarité de l'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de BET (le nombre de cycles PCR nécessaires varie selon l'abondance de l'ARN).

Les réactions qPCR sont effectuées dans un volume final de 20 μ l dans des plaques 96 puits (Roche), ou des tubes PCR, (Stratagene) selon l'appareil utilisé (appareils : LightCycler 480 de Roche, ou MxP Stratagene). A 4 μ l d'une dilution au 1/8 des ADNc obtenus sont ajoutés les amorces spécifiques des régions d'intérêt (1,2 μ l d'un mélange à 5 μ M chacune), ainsi que 10 μ l d'un mélange contenant tous les réactifs nécessaires à la qPCR, dont l'enzyme et le fluorochrome SYBR Green (longueur d'onde d'excitation : 492nm ; longueur d'onde d'émission : 516nm) qui sera incorporé de manière non spécifique et homogène à l'ADN amplifié (MESA Green Mastermix Plus SYBR, Eurogentec). Le programme contient une étape de dénaturation de 10min à 95°C, suivie de 40 cycles comprenant des étapes de 30sec chacune : dénaturation à 95°C, hybridation à 60°C, polymérisation à 72°C. Le programme se termine par une dernière étape permettant d'établir la courbe de dissociation du produit PCR final ; 1min 95°C ; 30sec 60°C ; 30sec 95°C.

L'analyse des données générées par la qPCR, à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil (MX-Pro pour le Stratagene, et Exor4 pour le Roche) permet d'extraire la valeur du seuil d'amplification linéaire, correspondant au nombre de cycle PCR minimal pour amplifier une région d'intérêt de manière linéaire. Les niveaux d'ARN correspondant à une région d'intérêt, et une région contrôle, sont quantifiés relativement aux niveaux des mêmes ARN chez une souche contrôle sauvage. Le niveau d'ARN de la région d'intérêt est alors normalisé à celui de la région contrôle, afin d'affranchir le résultat de la variabilité de traitement d'un échantillon d'ARN à l'autre. La région contrôle correspond à un gène de ménage dont le niveau d'expression ne varie pas d'une condition à une autre.

5.4. Test d'épissage des ARN

Les tests d'épissage sont basés sur la détection de toutes les formes, épissées ou non, d'un ARN spécifique, lorsque celui-ci est polyadénylé. Les ARN totaux extraits de différentes cellules de *S. pombe* suivant la méthode décrite dans le paragraphe 4, puis traités à la DNase, subissent une transcription inverse, comme décrit dans les paragraphes 5.1 et 5.2. Lors de l'étape de RT, seuls les ARN polyadénylés sont rétro-transcrits en utilisant des amorces oligo-dT (1µl du mélange des 3 amorces PV336, PV337, et PV338 à 2µM chacune).

Les ADNc (2µl) sont amplifiés de manière spécifique par PCR (Table M4, PCR après RT) avec le programme constitué d'une étape de pré-dénaturation d'1min à 95°C, suivie de 29 cycles de 1min à 95°C, 1min à 52°C, et 2min à 72°C, et se terminant par une étape de 10min à 72°C. Les amorces utilisées pour chaque gène testé dans la PCR sont : *cdc2* : PV490/342 ; *crs1* : PV339/340 ; *spo5* : PV368/369 et *rec8* : PV345/346.

Après PCR, les amplicons sont analysés par électrophorèse. Les ARN issus d'un même gène et dont le niveau de maturation par épissage est différent, donneront des amplicons de tailles différentes.

Une PCR permettant l'amplification de produits radiomarqués peut également être réalisée, dans le but d'améliorer la sensibilité de détection et de permettre une quantification. La PCR radioactive est alors effectuée dans les conditions décrite dans la Table M4, et analysée selon la méthode décrite dans les paragraphes 7.5 et 7.6.

6. Analyse transcriptomique

6.1. Préparation des échantillons

Les ARN totaux ont été extraits au laboratoire à partir de deux cultures indépendantes des souches SPV8, SPV481 et SPV903, selon les conditions décrites dans le paragraphe 4. Après une étape de digestion à la DNase I (30min, paragraphe 5.1), la qualité des ARN a été testée par électrophorèse ainsi que par RT suivies de qPCR contrôles

Le traitement et l'analyse des données de la puce ont été réalisés par la plateforme ProfileXpert (Bron, France).

6.2. Marquage des ARN, hybridation et détection des signaux

L'analyse transcriptomique a été réalisée en suivant les instructions du manuel Affymetrix WT Double-Stranded Target Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) à partir d'une puce d'oligonucléotides à haute densité (GeneChip *S. pombe* Tiling 1.0FR Array, Affymetrix). Brièvement, l'ARN total (7µg) a été rétrotranscrit en ADN double brin. Après lavage, 7,5µg d'ADNdb a été fragmenté et marqué à l'extrémité 3' par ajout d'une biotine. L'ADNdb a été dénaturé dans le tampon d'hybridation et hybridé sur la puce pendant 16h à 45°C avec un mouvement constant de rotation à 60 tours par minute dans un four à hybridation GeneChip 640 (Affymetrix). Les puces ont été lavées et colorées avec de la streptavidine-phycoérythrine (Invitrogen Corporation, CA, USA) à l'aide d'une station Fluidic 450 (Affymetrix). Les puces ont été scannées avec un laser confocal (GeneChip Scanner 3000, Affymetrix). Puis les fichiers CEL contenant l'ensemble des données de la puce ont été générés en utilisant le logiciel Affymetrix GeneChip Command Console 3.0 (AGCC). Les fichiers CEL sont disponibles dans la base de données GEO sous le numéro d'accès **GSEXXXXX**.

6.3. Annotation des sondes

Les séquences des sondes (à partir du fichier Affymetrix BMAP) ont été alignées sur la séquence du génome de *S. pombe* (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/yeast/pombe/GFF/pombe_290110.fasta), en utilisant Starr, un contenu R/Bioconductor. Les séquences des sondes ont été cartographiées sur une position unique du génome et un nouveau fichier BMAP a été construit (disponible sur demande ; Zacher et al., 2010).

6.4. Normalisation des données

Les données obtenues ont été normalisées avec la suite logicielle Partek Genomic 6.5 (Partek Inc, St. Louis, MO, USA) en utilisant l'algorithme statistique Robust Multiarray Average (RMA), qui inclut une correction du bruit de fond et une normalisation par quantile.

6.5. Analyse différentielle de l'expression des régions annotées

Pour l'analyse différentielle de l'expression des régions annotées (gènes codants et non codants), une seconde étape de normalisation a été appliquée en utilisant la suite logicielle Partek Genomics : la « summarization » médiane a été réalisée en utilisant les annotations de gènes disponibles sur la base de données Ensembl Fungi (EF1). Ceci permet d'assigner aux données obtenues pour l'ensemble des sondes d'un gène donné un seul nombre qui représente la valeur médiane. La base de données d'annotations de gènes utilisée contient des gènes codants et non codants comme les ARNr, ARNt, ARNsn, snoRNAs ou les pseudogènes.

Une analyse par permutation entre les échantillons SPV481 et SPV8 a été réalisée afin d'augmenter le jeu de données. Pour cela, chaque échantillon d'un groupe a été comparé avec chaque échantillon de l'autre groupe et seuls les gènes présentant une variation de 1,5 fois ont été retenus. La même comparaison a été réalisée entre les échantillons SPV903 et SPV8.

Enfin, un gène a été considéré comme exprimé de manière différentielle entre les souches SPV903 et SPV481 seulement si le rapport des médianes FC (Fold Change) : $FC(SP903/SPV8)/FC(SP481/SPV8)$ était au-dessus de 1,5 ou en dessous de -1,5.

6.6. Analyse par segmentation des régions non-annotées

Afin de détecter l'expression différentielle des régions non-annotées, la valeur moyenne entre les duplicats a été calculée pour chaque sonde. L'analyse par segmentation a

été effectuée avec des critères différents : i) la région a été considérée comme dérégulée seulement si les sondes présentent une différence de signal d'hybridation de 1,5 fois (échelle linéaire) ; ii) les régions sélectionnées doivent être supérieures à 100 paires de bases et contenir 5 sondes avec pour chacune une variation du signal moyen d'hybridation de 1,5 ; iii) un écart de 100pb maximum a été autorisé. Cette analyse a été effectuée pour comparer les échantillons SPV481 avec les échantillons SPV8, puis SPV903 avec SPV8. Les régions sélectionnées ont été visualisées à l'aide du programme Integrated Genome Browser (IGB <http://www.bioviz.org/igb> ; Nicol et al., 2009).

7. Test de « silencing »

Les tests de « silencing » permettent d'évaluer l'expression d'un gène rapporteur, le gène *ura4*, placé dans différents contextes chromatinien. Ce gène est impliqué dans la voie de synthèse de l'uracile, une base azotée essentielle au développement des levures.

La stratégie des tests de « silencing » repose sur l'utilisation de l'acide 5-fluoro-uracique (5-FOA), un composé non toxique pour les cellules n'utilisant pas la voie de synthèse de l'uracile, comme par exemple des cellules n'exprimant pas le gène *ura4*. Ce composé est transformé en 5-fluoro-uracile, un composé toxique, par les cellules exprimant correctement le gène *ura4*, ce qui provoque la mort des cellules. Ainsi, les levures sauvages pour le gène *ura4* ne se développent pas en présence de 5FOA. Pour les tests de « silencing », le même nombre de cellules est déposé sur différents milieux contenant du 5FOA (1g/l), ou des milieux dans lesquels l'uracile est absent. Sur un milieu dépourvu en uracile, la voie métabolique de synthèse de ce composé est activée : seules les cellules sauvages exprimant correctement le gène *ura4* sont capables de se développer. La capacité de pousser des cellules est comparée d'un milieu à l'autre, afin d'évaluer le niveau d'expression du gène *ura4*. Les cellules sont également toujours étalées sur des milieux non sélectifs, afin de vérifier d'éventuels défauts de pousser non liés aux agents de sélection.

Les tests de « silencing » sont réalisés à partir de cellules produites dans 4ml de cultures non saturées ($DO_{600} < 2$) en milieu YEA. Une quantité de 1×10^7 cellules sont prélevées, lavées avec 500µl de milieu Emm (centrifugation de 2 à 3min à 880g à

température ambiante). Les cellules sont remises en suspension dans 275µL d'Emm, et subissent 5 dilutions en série d'un facteur 10 dans du milieu Emm, dans une plaque 96 puits stérile. Les cellules sont alors déposées sur différents milieux solides : des milieux non sélectifs de type YEA, PMGc, et Emmc, ces mêmes milieux supplémentés par 1g/l de 5-FOA, ou des milieux PMGc-ura et Emmc-ura. L'utilisation des milieux minimum permet de contrôler la concentration en uracile. Les milieux riches (YEA) contiennent tous les nutriments nécessaires dans des concentrations plus élevées et permettent de vérifier le développement normal des cellules. Les boîtes sont incubées à 32°C pour 2 à 3 jours.

8. Test de sporulation

Les tests de sporulation ont été réalisés à partir de cultures de levures homotalliques h90 en phase exponentielle de croissance (DO_{600} de 0,5) en milieu YEA. 10^5 cellules sont déposées sur un milieu SPAS et incubées à 30°C pendant 2 jours. L'efficacité de sporulation des cellules a été visualisée et comparée à celle de la souche sauvage après exposition à la vapeur d'iode (Sigma) qui permet de colorer les spores en marron foncé, comme cela a été décrit précédemment (Gutz and Doe, 1973). L'efficacité de sporulation a été quantifiée par un comptage des asques contenant les 4 spores à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Pour chaque souche testée, au moins 400 cellules ont été comptées, à partir d'un minimum de 3 tests indépendants.

9. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

9.1. Principe

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permet d'examiner l'association *in vivo* d'une protéine avec une région d'intérêt du génome. Le principe repose sur i) la création d'une liaison covalente *in vivo* entre les protéines et l'ADN grâce à l'introduction d'agent de pontage dans les cellules (formaldéhyde), ii) la fragmentation de la chromatine (par sonication), iii) l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt avec un

anticorps spécifique, iv) la purification de l'ADN éventuellement associé à la protéine d'intérêt, v) l'amplification sélective d'ADN par PCR, vi) la quantification de l'enrichissement de l'ADN après migration sur un gel non dénaturant (Figure 31).

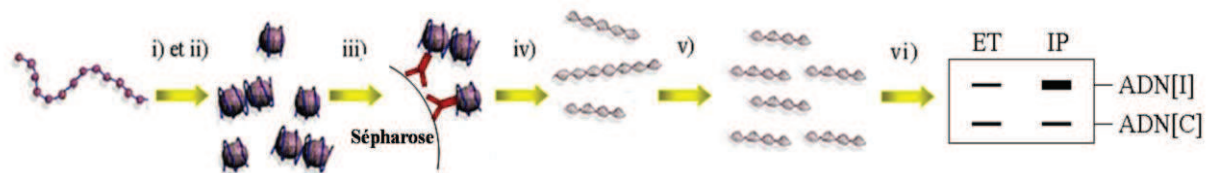


Figure 31. Principe de la ChIP. Voir le texte pour plus de détails.

9.2. Préparation des lysats cellulaires

Les cellules de levure sont cultivées dans du milieu YEA à 32°C. 50mL de cellules en phase exponentielle de croissance ($\approx 1,3 \times 10^9$ cellules à une DO_{600} de 1 à 1,5) sont fixées par 1% (p/v) de paraformaldéhyde pendant 15min à température ambiante, sous agitation. Le formaldéhyde libre est neutralisé par l'ajout de glycine à une concentration finale de 0,125M, et agitation 5min à température ambiante. Les cellules sont lavées 2 fois dans 20mL de tampon TBS froid (Tris Buffered Saline : 20mM Tris-HCl pH 7,6; 150mM NaCl) et centrifugées 5min à 400g à 4°C. Ce culot peut se conserver plusieurs mois à -80°C après congélation instantanée dans de l'azote liquide. Le culot de cellules est remis en suspension dans 360µL de tampon de lyse froid (50mM HEPES-KOH pH 7,5; 140mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% sodium déoxycholate; 1mM PMSF; 1mM Benzamidine; 1µg/ml Leupeptine; 1µg/ml Bestatine; 1µg/ml Pepstatine ; 1µg/ml Aprotinine), auxquels sont ajoutées 1ml de billes de verre froides (0,5mm de diamètre, Biospec). Les cellules sont cassées dans un mini bead-beater (Biospec) par 4 cycles de 90sec d'agitation à puissance maximale interrompus par 2min de refroidissement dans la glace. Le fond des tubes de lyse est percé à l'aide d'une aiguille de diamètre inférieur à celui des billes de lyse, et la totalité de l'extrait protéique est transférée dans un nouveau tube Eppendorf par une centrifugation de 2min à 600g à 4°C. Le surnageant récupéré est soniqué, dans un bain d'eau à 4°C, par 6 cycles de 30sec à une puissance 240 W (Bioruptor, de Diagenode) et un temps d'arrêt de 30sec, ce qui produit des fragments d'ADN d'une taille moyenne de 150 à 600 nucléotides.

Les débris cellulaires insolubles sont éliminés par 5min de centrifugation à 16000g à 4°C. A cette étape, 50µl (=14% du volume total) du lysat sont prélevés, dilués dans 200µl de tampon ET (Extrait Totaux : 10mM Tris-HCl pH8,0 ; 10mM EDTA ; 1% SDS), et conservés dans la glace pour toute la durée de l'immunoprécipitation. Ce prélèvement correspond à l'extrait total (ET), et permet de contrôler l'homogénéité de la lyse et de la sonication. Le reste du lysat (310µl) est utilisé pour l'immunoprécipitation.

9.3. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation de protéines étiquetées avec le peptide TAP (Tandem Affinity Purification ; Chp1-TAP, Tas3-TAP, TAP-mmi1) est réalisée avec des billes de Sépharose couplées aux Immunoglobulines G (Fast Flow, GE Healthcare) qui vont s'associer à la protéine A de l'étiquette TAP. Les billes sont préalablement lavées 3 fois avec 1ml de tampon de lyse froid (centrifugation à 500g pendant 1min, à 4°C). Le lysat est incubé avec l'équivalent de 10µl de billes pendant 2 à 4h à 4°C, sous agitation orbitale.

L'immunoprécipitation de protéines étiquetées avec l'épitope Myc (Chp1-13Myc, Myc3-Ago1) est réalisée avec 0,35µg d'anticorps anti Myc 9E10 (0,35% p/p; souris; Covance ; référence : MMS-150P; 0,7mg/ml) pour 1µg de protéines totales estimées par dosage de Bradford (Biorad). Le mélange est incubé pendant 3h à 4°C sous agitation orbitale. Un échantillon contrôle identique est également incubé sans anticorps. Celui-ci sera utilisé lors de la quantification de l'ADN immunoprécipité (voir le paragraphe 7.5). L'immunoprécipitation des histones H3 dont la lysine 9 est diméthylée (H3K9me2) est réalisée avec 2µg d'anticorps anti-H3K9me2 par échantillon (souris; Abcam ; référence : ab1220; 1mg/ml), avec un échantillon contrôle sans anticorps. Le complexe associé à l'anticorps est immunoprécipité 1h à 4°C après l'ajout de 20µl de billes de Sépharose couplées à la protéine A (4 Fast Flow, GE Healthcare), préalablement lavées 3 fois dans du tampon de lyse.

Après immunoprécipitation, la Sépharose est lavée 5min à température ambiante dans 1ml de tampon de lyse, puis 1ml de tampon de lyse à 500mM NaCl, dans 1ml de tampon de lavage (10mM Tris-HClpH8,0 ; 0,25M LiCl; 0.5% NP-40; 0,5% sodium déoxycholate; 1mM EDTA), et enfin dans 1ml de tampon TE 1X (10mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA). Les protéines

immunoprécipitées sont éluées de la Sépharose en ajoutant 100µL de tampon d'éluion (50mM Tris-HClpH8,0 ; 10mM EDTA; 1% SDS), et en incubant à 65°C pendant 15min. Après une centrifugation de 30sec à 12000g, l'éluat est transféré dans un nouveau tube. Les billes sont lavées avec 150µL de tampon TES (10mM Tris-Cl pH8,0 ; 1mM EDTA ; 0,67% SDS), et le surnageant récupéré est ajouté au précédent. A partir de cette étape, les 250µL d'extrait total (ET) conservés dans la glace subissent de nouveau les mêmes traitements que les produits de l'immunoprécipitation (IP). Le pontage crée par le formaldéhyde est éliminé par chauffage de l'éluat à 65°C pendant 6 à 14h.

9.4. Purification de l'ADN immunoprécipité

Les protéines sont digérées par l'ajout de 200µL de TE1X contenant 100µg de Protéinase K (PCR Grade, Roche) et incubation du mélange pendant 30min à 65°C. L'ADN est alors purifié au phénol-chloroforme (méthode classique décrite dans le paragraphe 2.3.), et précipité à l'éthanol et au chlorure de lithium, préféré à l'acétate de sodium car plus adapté aux fragments de petite taille. Les culots sont remis en suspension dans 20µL de tampon TE 1X contenant 0,5µg/ml de RNase (DNase free, Roche) et incubés 1h à 37°C pour digérer les ARN.

9.5. Analyse par PCR radioactive de l'ADN immunoprécipité

L'ADN purifié ci-dessus nécessite une étape d'amplification afin d'être analysé. Une PCR en présence de phosphore 32 permet le marquage des amplicons et ainsi une semi-quantification de l'ADN immunoprécipité. La technique de qPCR peut également être utilisée afin de quantifier de manière plus précise un ADN immunoprécipité d'intérêt.

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 12,5µL (voir la table 5 pour la composition), et contiennent à la fois des amorces spécifiques de la région d'intérêt, et du gène contrôle utilisé pour la quantification (PCR multiplex). La région contrôle correspond à un gène de ménage non ciblé et régulé par le RNAi ou Mmi1. Le programme PCR comprend un premier cycle constitué d'une dénaturation initiale de 2 min à 95°C, d'une hybridation

d'1min à 52°C, et d'une pré-élongation d'1min à 72°C suivi de 27 cycles de 30sec à 95°C, 30sec à 52°C et 1min à 72°C, suivi d'une dernière étape d'élongation de 5min à 72°C. Pour un marquage radioactif 0,15µl de [α -³²P] dCTP à 10mCi/ml (Perkin Elmer) sont ajoutés à la réaction. Les différents produits PCR sont séparés par migration sur gel natif de polyacrylamide (6% p/v). La migration s'effectue à 110V pendant 80 à 100 min. Le gel est séché sous vide à 80°C pendant 20 min. Les produits PCR sont visualisés après exposition sur un écran phosphor, scanné par l'intermédiaire d'un Phosphor Imager.

9.6. Quantification des enrichissements

Les produits PCR sont quantifiés par le logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics), qui mesure l'intensité du signal radioactif présent sur le gel. Chaque PCR est réalisée avec deux couples d'amorces : le premier couple amplifie la région d'ADN possiblement associée à la protéine Immunoprécipitée (ADN[I]) et le deuxième une région Contrôle qui n'interagit pas avec cette protéine (ADN[C], Figure 28). Le calcul du rapport des signaux obtenus pour les deux PCR, réalisées à partir de l'extrait total ($\text{ADN[I]}_{\text{ET}}/\text{ADN[C]}_{\text{ET}}$), permet de prendre en compte le nombre relatif de copies des deux régions d'ADN présentes avant immunoprécipitation ainsi que l'efficacité des couples d'amorces. Le même rapport calculé pour la PCR réalisée à partir des échantillons immunoprécipités ($\text{ADN[I]}_{\text{IP}}/\text{ADN[C]}_{\text{IP}}$) correspond à l'enrichissement dû à l'immunoprécipitation. Le ratio $(\text{ADN[I]}_{\text{IP}}/\text{ADN[C]}_{\text{IP}})/(\text{ADN[I]}_{\text{ET}}/\text{ADN[C]}_{\text{ET}})$ permet ainsi de connaître l'enrichissement relatif pour la région analysée. Ce ratio calculé à partir des échantillons ayant subi l'immunoprécipitation sans anticorps (ou de la souche non étiquetée pour une IP anti-TAP) représente le signal non spécifique associé à l'immunoprécipitation. Les valeurs obtenues pour chaque échantillon immunoprécipité avec un anticorps sont ensuite normalisées en effectuant le ratio avec la valeur obtenue pour l'échantillon ayant subi l'immunoprécipitation sans anticorps (ou la souche non étiquetée pour une IP anti-TAP).

10. Immunoprécipitation de l'ARN (RIP)

10.1. Principe

La technique d'immunoprécipitation de l'ARN (RIP) est une technique voisine de la ChIP. Elle permet d'étudier l'association *in vivo* d'une protéine avec une région d'un ARN d'intérêt. Le principe est globalement le même que celui de la ChIP. Il repose sur i) la création d'une liaison covalente *in vivo* entre les protéines et l'ARN grâce à l'introduction d'agent de pontage dans les cellules, ii) la fragmentation modérée de l'ARN (par sonication), iii) la digestion de l'ADN, iv) l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique, v) la purification de l'ARN, vi) la synthèse d'ADNc vii) l'amplification sélective des ADNc par PCR quantitative.

10.2. Préparation des lysats cellulaires

La fixation des cellules suivie de leur lyse est le même que pour la ChIP (paragraphe 7.2). Le processus de lyse des cellules fixées est le même que pour la ChIP : les cellules sont remises en suspension dans 400µl de tampon de lyse froid (50mM Hepes-NaOH pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% sodium déoxycholate; 5mM DTT; 1mM PMSF; 1mM benzamidine; 100U/ml RNaseOUT (Invitrogen)), puis broyées dans le mini Bead-Beater. Le lysat est soniqué, de la même façon que pour les ChIP, par 3 cycles de 30sec de sonication à la puissance de 240W (Bioruptor, de Diagenode) et un temps d'arrêt de 30sec. Les débris cellulaires insolubles sont éliminés par 5min de centrifugation à 16000g à 4°C.

10.3. Digestion de l'ADN

L'ADN génomique présent dans l'extrait est éliminé par digestion à la DNase. Cette étape de digestion permet d'immunoprécipiter de manière spécifique l'ARN associé à la protéine, et non un ARN associé à un ADN. A 400µL du lysat clarifié, on ajoute 50µL de tampon DNase 10X (250mM MgCl₂ ; 50mM CaCl₂), et 50µL de tampon de lyse contenant 700 unités de DNase I (RNase free, from Bovine Pancreas, Sigma). Le mélange est incubé 1h à 30°C. La DNase I est alors neutralisée par l'ajout d'EDTA à 20mM final, et l'échantillon est

clarifié par deux centrifugations successives de 5min à 16000g à température ambiante puis à 4°C. A cette étape, l'ET est prélevé (50µl du lysat =10% du volume total), et dilué dans 200µL de tampon ET (10mM Tris-HCl pH8,0 ; 10mM EDTA ; 1% SDS ; 5mM DTT, 10U/ml RNaseOut). Le reste du lysat est utilisé pour l'immunoprécipitation.

10.4. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation des protéines étiquetées avec les peptides TAP, 13myc ou Flag se déroule dans les mêmes conditions expérimentales que pour les CHIP (paragraphe 6.3.).

La protéine Mmi1 endogène est immunoprécipitée avec 0,8% p/p d'anticorps anti-Mmi1 (lapin ; Eurogentec ; réf. 556 ; 0,24mg/ml) par incubation avec un mouvement de rotation pendant 3h à 4°C. Un échantillon contrôle identique est également incubé sans anticorps. Celui-ci sera utilisé lors de la quantification de l'ARN immunoprécipité. 20µL de billes de Sépharose couplées à la protéine A (GE Healthcare) préalablement lavées 3 fois dans du tampon de lyse, sont ajoutés, et l'incubation continue pour 1h afin d'immunoprécipiter le complexe Mmi1 / anti-Mmi1.

Après immunoprécipitation, la Sépharose est lavée deux fois 5min à température ambiante dans 1ml de tampon de lyse contenant 10U/ml de RNaseOut, puis avec 1ml de tampon de lyse à 500mM NaCl (avec 50mM d'Hepes-KOH pH7,5 au lieu de l'Hepes-NaOH), 1ml de tampon de lavage (10mM Tris-HCl pH8,0 ; 0,25M LiCl; 0,5% NP-40; 0,5% sodium déoxycholate; 1mM EDTA ; 5mM DTT ; 10U/ml RNaseOut), et enfin dans 1ml de tampon TE 1X (10mM Tris-HCl pH8,0 ; 1mM EDTA ; 5mM DTT ; 10U/ml RNaseOut). Les protéines immunoprécipitées sont éluées de la Sépharose en ajoutant 100µL de tampon d'éluion (50mM Tris-HCl pH8,0 ; 10mM EDTA; 1% SDS ; 5mM DTT ; 10U/ml RNaseOut), et en incubant à 65°C pendant 15min. Après une centrifugation de 30 sec à 12000g, l'éluat est transféré dans un nouveau tube. Les billes sont lavées avec 150µL de tampon TES (10mM Tris-Cl pH8,0 1mM EDTA, 0,67% SDS ; 5mM DTT ; 10U/ml RNaseOut), et le surnageant récupéré est ajouté au précédent. A partir de cette étape, les 250µl d'ET conservés dans la glace subissent de nouveau les mêmes manipulations que les produits de l'immunoprécipitation (IP).

10.5. Purification de l'ARN immunoprécipité

La digestion des protéines est combinée avec l'étape d'élimination du pontage créée par le formaldéhyde : l'échantillon est incubé avec 200µl de TE1X contenant 5mM DTT, 10U/ml RNaseOut et 100µg de Protéinase K (Roche) à 65°C pendant 3h. Une incubation prolongée à 65°C induit une dégradation trop importante des ARN dans les échantillons ET.

L'ARN est alors purifié au phénol-chloroforme acide (solution 5-1 ; pH4,5 Ambion) en suivant le même processus que pour les ADN (paragraphe 2.3). L'ARN est ensuite précipité à l'éthanol et à l'acétate de sodium. Après un rapide séchage de 5min, les culots sont remis en suspension dans 13µl de tampon TE 1X contenant 5mM DTT et 10U/ml RNaseOut, et sont stockés à -80°C

10.6. Analyse de l'ARN immunoprécipité par RT-qPCR

L'ARN immunoprécipité subit une digestion à la DNase I puis une transcription inverse avec des amorces nucléotidiques hexamériques aspécifiques (paragraphe 5.1.et 5.2.).

La qPCR est réalisée selon les conditions décrites dans le paragraphe 5.3, à partir d'une dilution au quart de l'ADNc obtenu suite à la RT. Les enrichissements sont quantifiés de la même façon que pour les CHIP (paragraphe 9.6.).

-Résultats-

Chapitre I

Etude du rôle joué par le RNAi dans la régulation des gènes ciblés par Mmi1 et identification de nouveaux gènes cibles

1.1. Introduction

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, un organisme de référence pour l'étude des mécanismes contrôlant le cycle et la différenciation cellulaire (Forsburg and Nurse, 1991) le RNAi est impliqué dans la formation de l'hétérochromatine, une structure indispensable pour le maintien de la stabilité du génome et pour la répartition correcte du matériel génétique lors des divisions cellulaires mitotiques et méiotiques. La protéine Argonaute Ago1, au sein du complexe RITS (RNA-Induced Transcriptional gene Silencing), cible la chromatine de régions non codantes par l'intermédiaire des petits ARN produits par l'endonucléase Dicer1 (Dcr1), les siARN (small interfering ARN) pour réduire au silence l'expression de séquences non codantes et répétées (Grewal and Jia, 2007).

Ago1 et Dcr1 seraient également impliquées dans l'initiation du processus de différenciation sexuelle de manière indépendante du maintien des structures d'hétérochromatine (Carmichael et al., 2004 ; Stoica et al., 2006). Cependant les mécanismes moléculaires mis en jeu par ces protéines du RNAi sont restés inexplorés. Nos travaux présentés dans l'article de recherche révèlent une nouvelle fonction du RNAi chez *S. pombe* dans la régulation de l'expression de gènes méiotiques.

1.2. Résumé détaillé de l'article de recherche

Nous montrons que dans des cellules en cycle végétatif, le complexe RITS cible la chromatine du gène *mei4* (meiosis inducing gene 4), un facteur de transcription clé de la différenciation sexuelle (Horie et al., 1998), et du gène *ssm4* (suppressor of *sme2* gene 4) codant pour une protéine associée aux microtubules méiotiques, tous deux exprimés spécifiquement lors de la différenciation sexuelle (Mata et al., 2002). La présence de RITS s'accompagne de la marque H3K9me à la chromatine de ces gènes. Par ailleurs, RITS interagit également directement avec l'ARN issu de la transcription de ces deux gènes. L'association de RITS à la chromatine et à l'ARN de *mei4* et *ssm4* requiert pour une partie seulement les éléments du RNAi Dcr1 et Rdp1, ainsi que l'HMT de l'hétérochromatine Clr4. Lorsque les cellules initient la différenciation sexuelle, l'activation de l'expression du gène *mei4* est corrélée avec la perte de ce complexe à la chromatine et à l'ARN de ce gène, mais pas aux péricentromères.

D'autre part, nos recherches mettent à jour un mode de recrutement du RNAi tout à fait inédit. En effet, nous montrons que la séquence DSR du gène *mei4*, ainsi qu'une protéine de liaison à l'ARN, Mmi1 est absolument requise pour la présence de H3K9me ainsi que pour l'interaction de RITS à la chromatine et à l'ARN de *mei4*. Mmi1 a été identifiée pour son rôle fondamental dans la répression au niveau post-transcriptionnel de l'expression de gènes de la différenciation sexuelle, dans les cellules en cycle végétatif (Harigaya et al., 2006). D'après nos données, Mmi1 n'est en revanche pas impliquée dans le ciblage et le « silencing » des régions d'hétérochromatine constitutive par le RNAi.

Une étude transcriptomique nous a conduits à l'identification d'un ensemble de gènes dont l'expression est potentiellement régulée par Mmi1. Parmi les 250 gènes codants ainsi identifiés, plus de 70% sont des gènes de la différenciation sexuelle, dont 33 gènes impliqués dans la phase « précoce » de ce processus selon une classification établie en 2002 (c'est-à-dire 30% de l'ensemble des 97 gènes « précoces » ; Mata et al., 2002). Ces résultats confirment le rôle majeur de Mmi1 dans la régulation de la différenciation sexuelle. Nous avons analysé plus particulièrement les ARN exprimés durant la phase « précoce » de la différenciation, et nous montrons que Mmi1 et Chp1 s'associent à la majorité d'entre eux. Par ailleurs, nos données révèlent que l'ARNnc *meiARN* est la cible de Mmi1. Ce dernier

résultat nous a permis d'identifier par une analyse bioinformatique le motif hexamérique consensus dégénéré reconnu spécifiquement par Mmi1, permettant ainsi de prédire les ARN ciblés directement par Mmi1 et Chp1. De manière importante, tous les ARN pour lesquels l'association de Mmi1 et de Chp1 a été confirmée présentent un enrichissement de ces motifs (au moins 6 motifs sur 850nts), appuyant ainsi notre modèle prédictif. Ces cibles directes représenteraient environ 12% de l'ensemble des gènes dont l'ARN s'accumule dans le mutant $\Delta mmi1$.

Enfin, nous mettons en évidence un rôle pour le RNAi et Clr4 dans la régulation de l'expression de ces gènes de la différenciation sexuelle. Nos résultats indiquent en particulier que le RNAi et Clr4 pourraient faciliter la répression de ces gènes en modulant la maturation de leurs ARNm au cours du cycle végétatif. Nous montrons également que cette régulation pourrait bien avoir des conséquences au niveau physiologique lors de la différenciation sexuelle. Nous mettons ainsi à jour une nouvelle fonction du RNAi chez *S. pombe*, en proposant une explication au niveau moléculaire : l'implication du RNAi dans la régulation de la différenciation sexuelle passerait par la régulation de ces gènes méiotiques, dont *mei4*.

Nous proposons que le RNAi coopère avec Mmi1 pour médier le « silencing » post-transcriptionnel nécessaire à l'inhibition de tout un programme transcriptionnel de la différenciation sexuelle au cours du cycle végétatif. Cette coopération serait importante pour l'activation appropriée de ce programme au grès de la progression de la cellule dans le processus de la différenciation.

1.3. Article de recherche

RNA-binding protein Mmi1 connects RNAi and Clr4/Suv39h to sexual differentiation-specific genes in fission yeast

Aurélia Vavasseur*, Edwige Hiriart*, Leila Touat-Todeschini*, Benoit Gilquin, Emeline Lambert, Nicolas Nazaret, Joel Lachuer, Daniel Perazza and André Verdel

(*: these authors contributed equally to this work)

Abstract

RNAi plays critical roles in sexual differentiation in a wide range of higher eukaryotes. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, RNAi acts together with the histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase Clr4/Suv39h to silence transcription of noncoding and repeated DNA on chromatin. Here, we show that deposition of H3K9 methylation and localization of the RNAi effector complex RITS to *mei4*, a key gene for sexual differentiation, require Mmi1, an RNA-binding protein that mediates silencing of an indeterminate number of meiosis-specific genes. A large-scale approach identified new Mmi1 mRNA targets and showed that most of them are expressed relatively early in sexual differentiation. Remarkably, a noncoding RNA expressed from *sme2* gene, and described to assist sexual differentiation, was also identified as a target of Mmi1. Chp1 a subunit of RITS associates to these RNA targets in a Mmi1-dependent manner. In parallel, functional analyses show that RNAi and Clr4/Suv39h are required for a robust Mmi1-mediated gene silencing. Thus, our results link RNAi and Clr4/Suv39h to the control of sexual differentiation gene expression program in yeast, they identify Mmi1 as a specificity determinant for recruiting RNAi and Clr4/Suv39h to chromatin and mRNA of developmentally-regulated genes, and they suggest that RNAi and Clr4/Suv39h might facilitate their silencing in proliferating cells.

Conditional localization of RITS to *mei4* gene and mRNA

In order to uncover the mechanism behind the recruitment of RNAi and Clr4 to *mei4* gene, we conducted a comparative analysis between their recruitment to *mei4* and to pericentromeric DNA repeats. Ago1 forms with Chp1 and Tas3 proteins the RITS complex that associates to pericentromeric heterochromatin (Verdel et al., 2004). We first asked whether RITS is recruited on *mei4* or just Ago1, by analyzing the localization of the other two RITS subunits, Chp1 and Tas3, using ChIP experiments. As shown in Figure 1A, both Chp1 and Tas3 localized to *mei4*, indicating that RITS, and not Ago1 by itself, is recruited to *mei4*. Because RITS localization to pericentromeric DNA repeats necessitates H3K9 methylation as well as siRNAs, we then examined RITS recruitment to *mei4* in *clr4Δ* and *dcr1Δ* mutant cells. Chp1 localization to *mei4* was reduced to near background level in *clr4Δ* cells and strongly impaired in *dcr1Δ* cells, indicating that RITS recruitment to *mei4* chromatin shows the same Clr4 and Dcr1 dependency as with pericentromeric repeats (Figure 1B).

As RITS recruitment to pericentromeric heterochromatin involves its binding to cenRNA, transcripts emanating from pericentromeric DNA repeats, we further assessed whether RITS associates to *mei4* messenger RNA, using RNA-IP experiments. All three subunits of RITS bind to *mei4* mRNA (Figure 1C, Supplemental Figure S1A, and data not shown). Moreover, RITS binding to *mei4* mRNA is partially dependent on Clr4 (Figure 1D), suggesting that RITS association to *mei4* mRNA might occur in a H3K9Me chromatin environment or that Clr4 methylates another protein, which once is methylated facilitates RITS recruitment. Importantly, Chp1 association to *mei4* mRNA in *clr4Δ* cells is not completely lost, whereas it is to cenRNA (Figure 1D). Furthermore, Chp1 association to *mei4* mRNA is only modestly lost in *dcr1Δ* cells, whereas it is dramatically reduced for the cenRNA. From these results, we concluded that RITS binding to *mei4* gene requires Clr4 and Dcr1, like at pericentromeric repeats. However, unlike at pericentromeric repeats, RITS association to *mei4* mRNA is only partly dependent on Clr4 and Dcr1. In agreement with RITS recruitment to *mei4* mRNA being regulated differently compared to cenRNA, RITS loses its binding to *mei4* mRNA but not to heterochromatic cenRNA, upon sexual differentiation of wild type diploid cells induced by nitrogen starvation (Supplemental Figure S1B). Moreover, RITS recruitment on *mei4* gene is gradually lost under the same conditions. Thus RITS binding to *mei4* mRNA might govern its binding to *mei4* chromatin (Supplemental Figure S1C).

Fig1. Vavasseur et al.

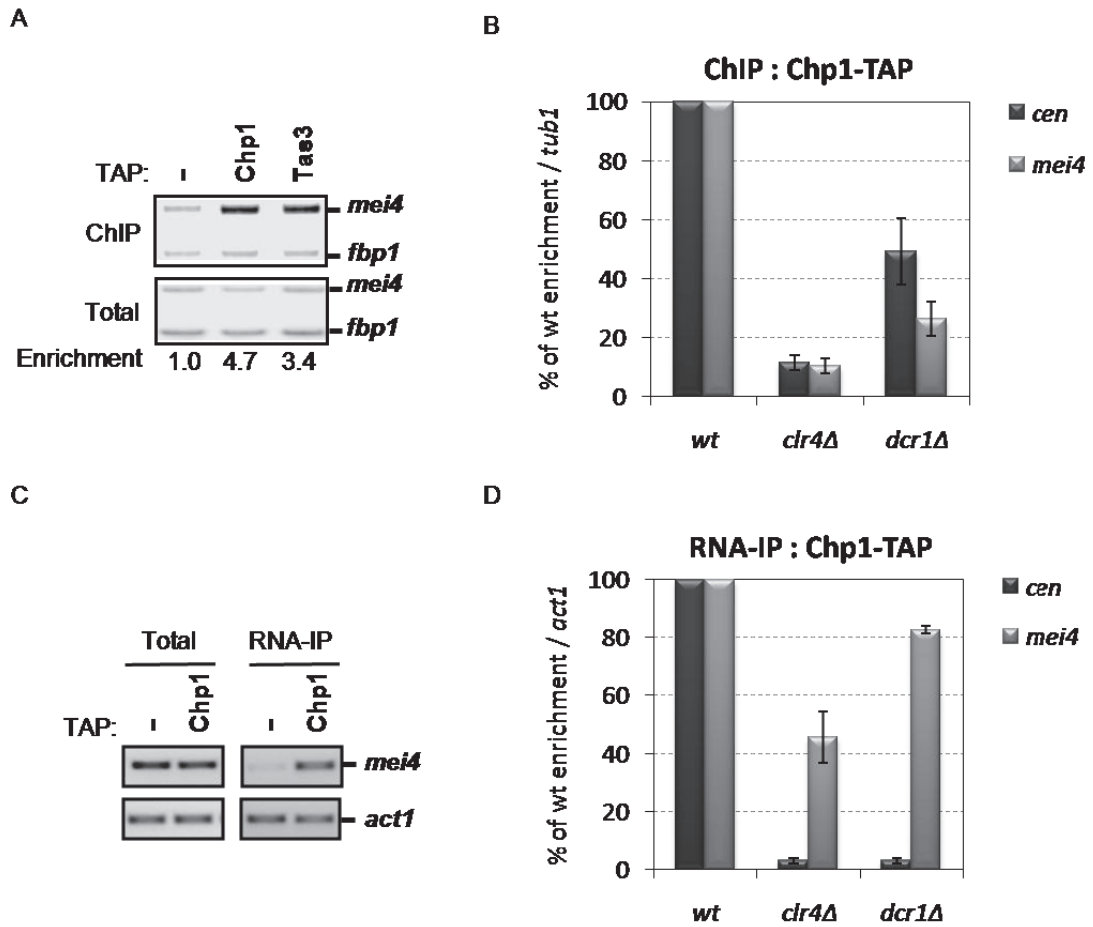
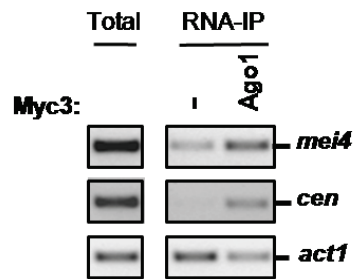


Figure 1. Conditional recruitment of RITS to *mei4* gene and mRNA.

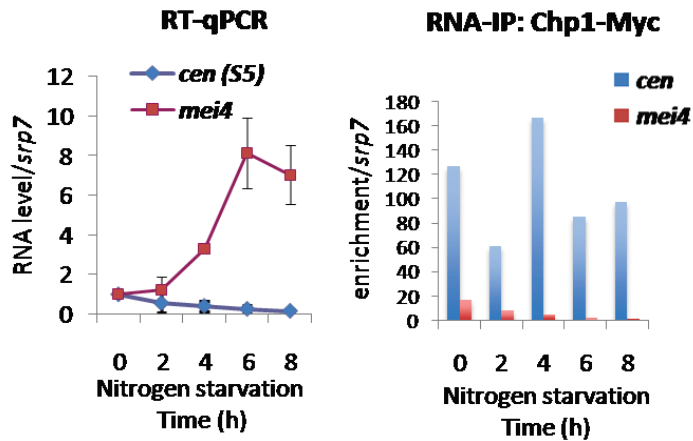
- (A) ChIP experiment showing that RITS subunits, Chp1 and Tas3, localize to *mei4* gene.
- (B) ChIP experiment showing that Chp1 localization to *mei4* gene and pericentromeric heterochromatin is similarly dependent on Clr4 and Dcr1.
- (C) RNA-IP experiment showing that Chp1 associates to *mei4* mRNA.
- (D) RNA-IP experiment showing that RITS association to *mei4* mRNA is only partially disrupted in *clr4Δ* and *dcr1Δ* cells, whereas it is dramatically reduced for cenRNAs.

Supplemental Figure S1. Vavasseur et al. Related to figure 1.

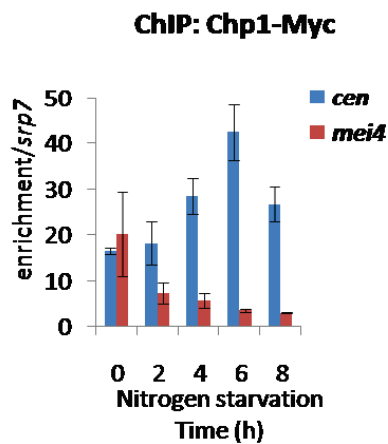
A



B



C



Supplemental Figure S1. Related to figure 1.

- (A) RNA-IP experiment showing that Ago1 associates to *mei4* mRNA.
- (B) Analysis of sexual differentiation induction in wild type diploid cell, by nitrogen starvation, showing that *mei4* progressive mRNA accumulation (left part of the panel) correlates with a gradual loss of Chp1 association to *mei4* mRNA (right part of the panel).
- (C) ChIP experiment showing that in identical conditions as in (B) Chp1 loses its localization to *mei4* gene but not to pericentromeric DNA repeats.

Mmi1 is required for RITS association to *mei4* mRNA as well as for RITS and H3K9Me chromatin localization to *mei4*

Because Chp1 binding to *mei4* transcript can occur in absence of Clr4 or Dcr1, we investigated whether an element in *mei4* transcript could be important for recruiting RITS to *mei4* mRNA, independently of Clr4 and Dcr1. The strategy we undertook consisted in making increasing truncations of *mei4* open reading frame, starting from its 3' end (Figure 2A). Using RNA-IP experiments, we then examined Chp1 binding to a region of *mei4* mRNA present in each deletion mutants, at the 5' end of its coding sequence. Deletion of up to half of *mei4* transcript did not impact on Chp1 binding (Figure 2B, compare wt lane with *mei4-1551* and *mei4-777* lanes). In contrast, an additional deletion of a 389 nucleotide region led to a dramatic loss of Chp1 association to *mei4* mRNA but not to *cenRNA* (Figure 2B, compare wt lane with *mei4-388* lane). To our surprise, the deleted region overlapped with most of *mei4* determinant of selective removal (DSR) sequence (Figure 2A), a region previously characterized as an RNA sequence critical for *mei4* silencing in vegetative cells and specifically recognized by Mmi1 RNA-binding protein (Harigaya et al., 2006). Removal of just the DSR sequence led to a similar loss of Chp1 binding (Supplemental Figure S2A). Because *mei4* DSR sequence is a direct target of Mmi1, we then asked whether Mmi1 itself plays a role in recruiting RITS to *mei4* mRNA. We found that Chp1 recruitment to *mei4* mRNA was similarly lost in *mmi1Δ* cells, suggesting that Mmi1 connects RITS to DSR containing mRNAs (Figure 2C).

Given that RITS and H3K9Me localize to *mei4* gene, we further investigated whether *mmi1Δ* deletion affects deposition of RITS and H3K9Me to *mei4*. As shown in Figure 2D, Chp1 recruitment to *mei4* is lost in *mmi1Δ* cells. In addition, methylation of H3K9 is entirely dependent on the presence of Mmi1 and Clr4 (Figure 2E), indicating that Mmi1 might directly or indirectly recruit Clr4 to *mei4*. We then investigated whether Mmi1 plays a role in recruiting RITS and Clr4 to heterochromatic regions. Our ChIP experiments conducted from *mmi1Δ* cells showed no significant change neither in RITS binding to pericentromeric, subtelomeric and mating-type heterochromatic regions (Supplemental Figure S2B) nor in H3K9 methylation levels at these regions (data not shown). These findings suggest Mmi1 has no role in recruiting RITS and Clr4 to constitutive heterochromatic regions. Consistent with this result, pericentromeric transcriptional gene silencing of a *ura4* reporter gene

inserted at a outer most repeat was not impaired in *mmi1Δ* cells (Figure 2F). Altogether these results demonstrate that Mmi1 is essential for RITS recruitment to *mei4* mRNA and gene as well as for deposition of H3K9 methylation on *mei4* gene. Furthermore, they strongly suggest that Mmi1 acts as a specificity determinant for recruiting RITS and Clr4 to *mei4* mRNA and gene.

Fig2. Vavasseur et al.

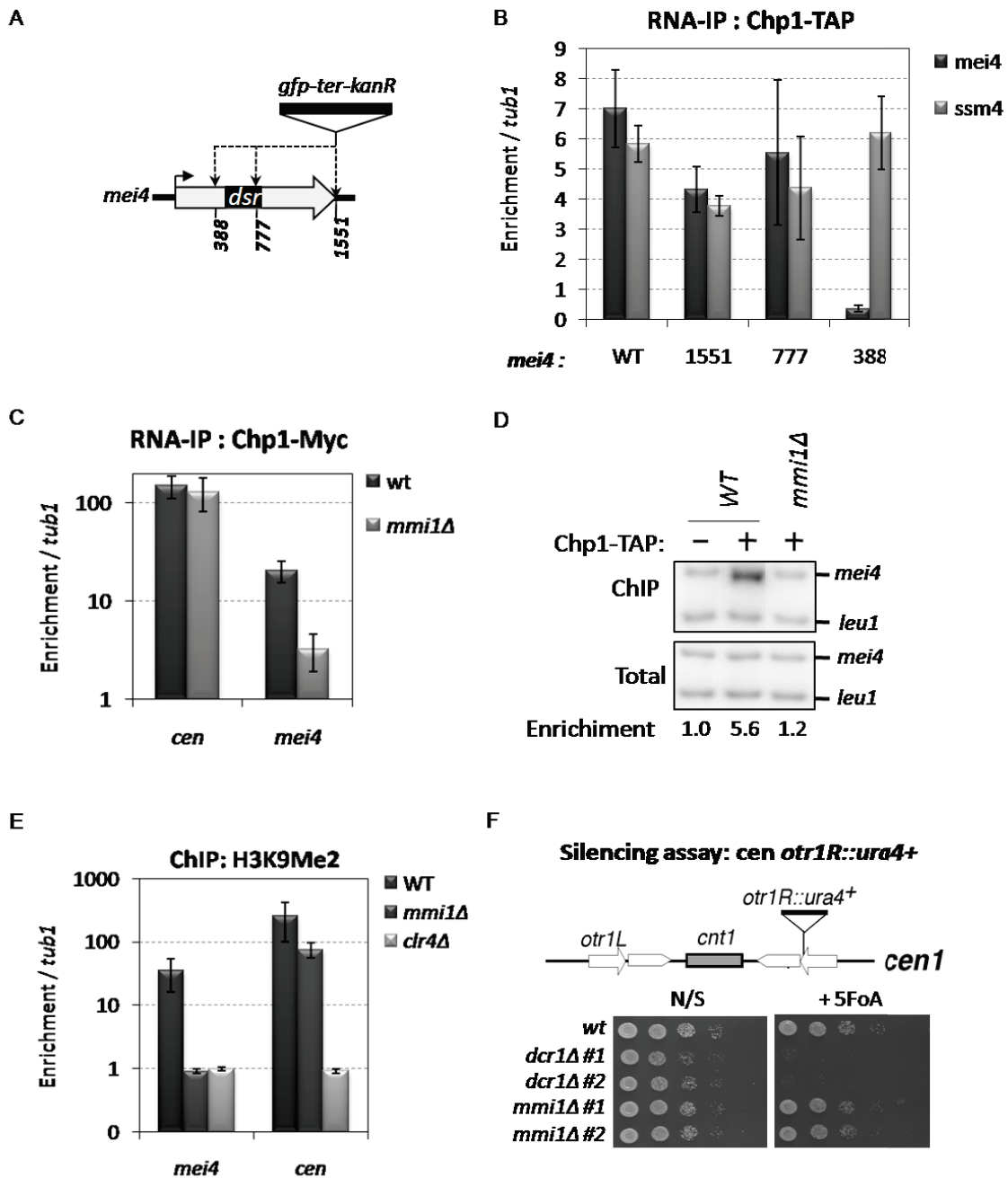
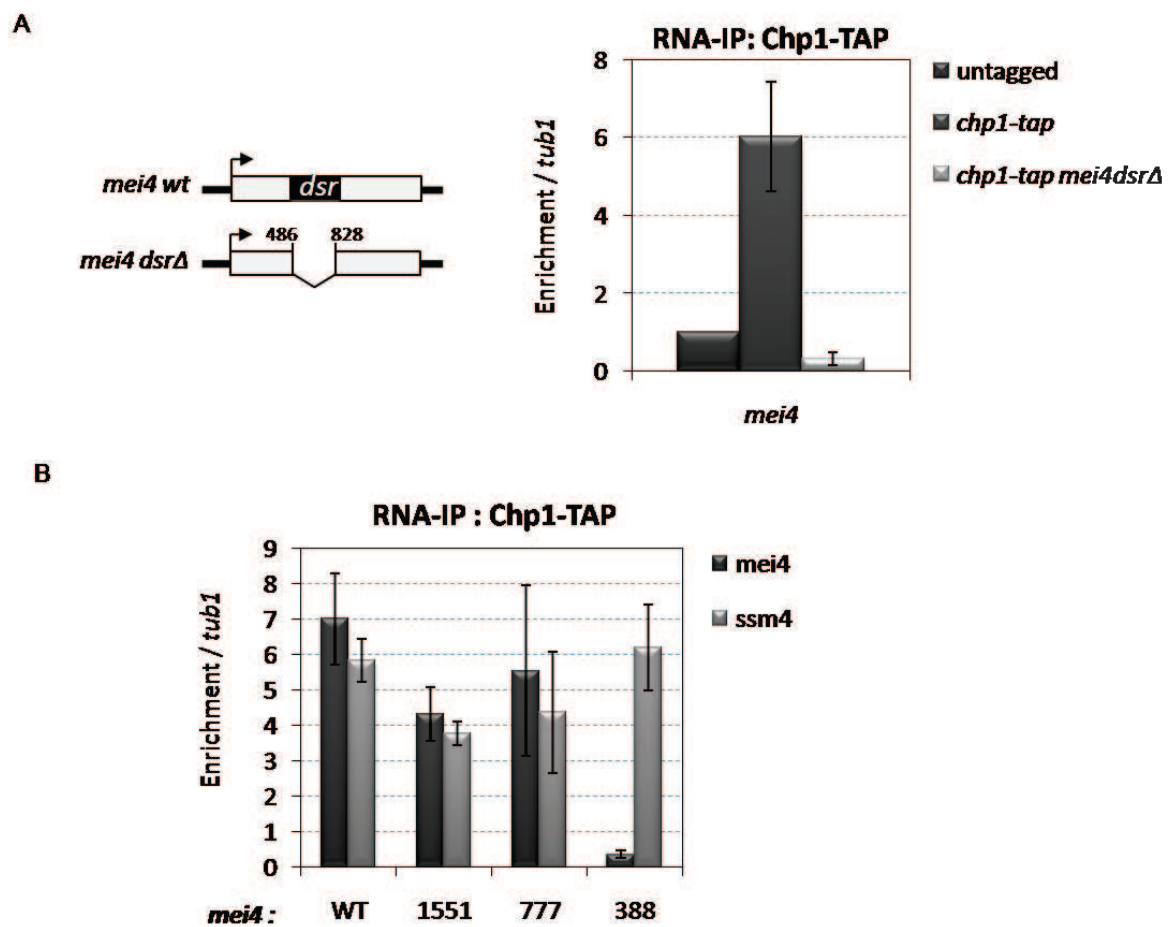


Figure 2. Mmi1 is required for RITS and H3K9Me localization to *mei4*.

(A) Diagram of *mei4* gene highlighting the three sites where the *gfp-ter-kanR* cassette was inserted (nucleotides 388, 777 and 1551) to gradually delete its open reading frame.

- (B) RNA-IP experiment showing that a fragment of *mei4* overlapping with *mei4* DSR sequence is critical for RITS recruitment to *mei4* mRNA. *ssm4* is another target of RITS, as shown in Supplemental Figure S3, and used here as a control of the RNA-IP experiment.
- (C and D) RIP and ChIP experiments showing a loss of RITS localization to *mei4* mRNA and gene, respectively, in *mmi1Δ* cells.
- (E) ChIP experiment showing that H3K9Me deposition on *mei4* is completely lost in *mmi1Δ* and *clr4Δ* cells but only lost in *clr4Δ* cells on *cen*.
- (F) Silencing assay showing no loss of silencing for *ura4* gene integrated at pericentromeric heterochromatin region *otr1R* in *mmi1Δ* cells.

Supplemental Figure S2. Vavasseur et al. Related to figure 2.



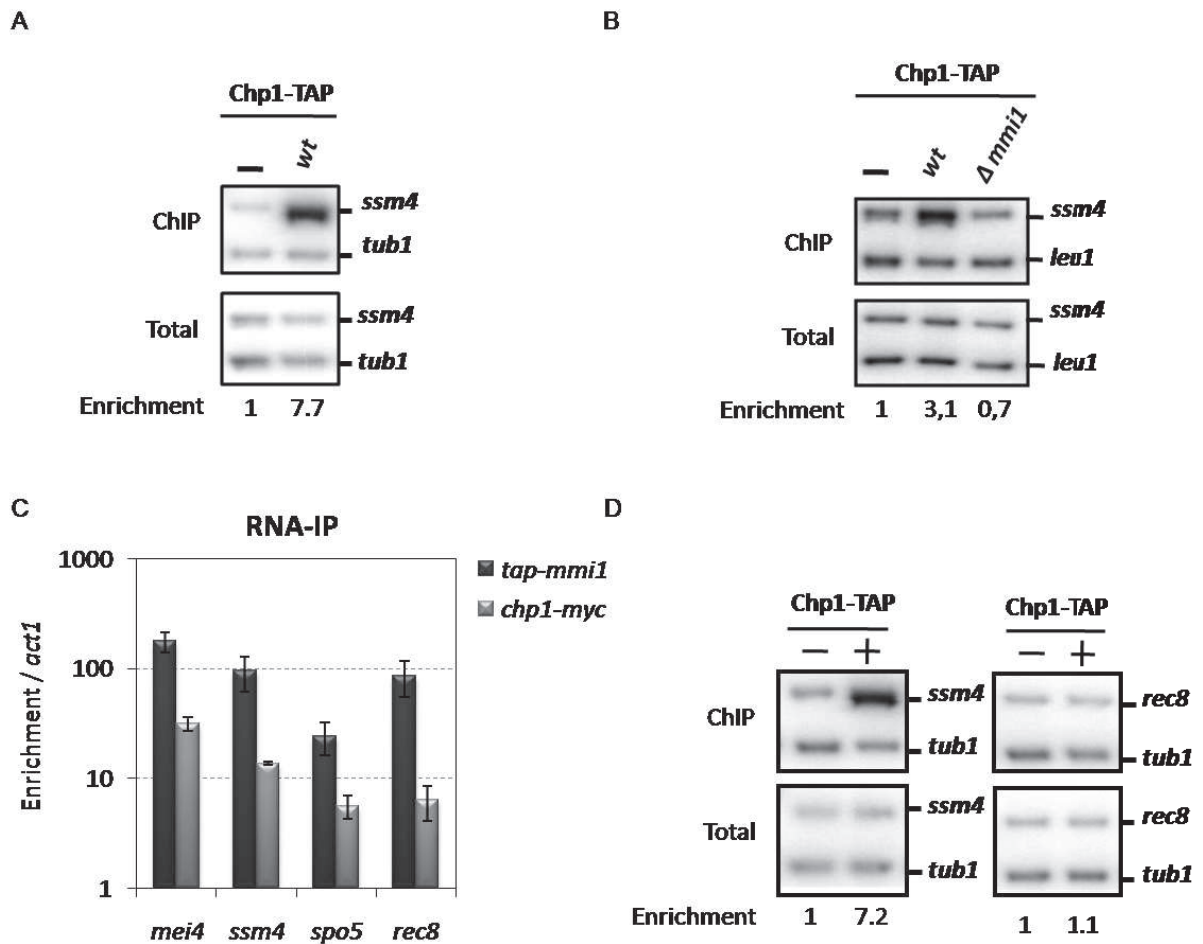
Supplemental Figure S2. Related to figure 2.

- (A) Diagram of *mei4* DSR sequence deletion (left side of the panel), and RNA-IP experiment showing that deletion of *mei4* DSR sequence leads to loss of RITS association to *mei4* mRNA (right side of the panel).
- (B) ChIP experiment showing that Chp1 binding to pericentromeric, subtelomeric and mating-type heterochromatic regions, is not impaired in *mmi1Δ* cells, whereas it is on both *mei4* and *ssm4*.

RITS associates to DSR-containing mRNAs without systematically binding to their cognate genes

ssm4 is the unique other meiotic gene to which Ago1 and H3K9 methylation mark were previously found to localize to (Cam et al., 2005 ; Zofall et al., 2006). Importantly, *ssm4* had been described as a DSR-containing gene (Harigaya et al., Nature, 2006). We thus checked whether RITS is recruited to *ssm4*. Indeed, Chp1 and Tas3 also bind to *ssm4* (Supplemental Figure S3A and data not shown). Furthermore, Chp1 and H3K9 methylation localization to *ssm4* is lost in *mmi1Δ* cells (Supplemental Figure S3B and data not shown). In addition to *mei4* and *ssm4*, two other meiotic genes, *spo5* and *rec8*, were shown to possess a DSR sequence and to be direct targets of Mmi1 *in vitro* (Harigaya et al., 2006). We tested whether RITS might associates to *spo5* and *rec8* mRNAs and genes *in vivo*, using RNA-IP and CHIP experiments, respectively. Chp1 does associate to *spo5* and *rec8* mRNAs (Supplemental Figure S3C). In contrast, we could not detect any crosslinking of Chp1 to *spo5* or *rec8* genes (Supplemental Figure S3D and data not shown). Thus, Chp1 associates to the four known DSR-containing RNAs but this association does not systematically correlates with its localization to the corresponding gene. These results imply that an unknown number of genes targeted by RITS have been missed by genome-wide ChIP on CHIP analyses.

Supplemental Figure S3. Vavasseur et al. Related to figure 2.



Supplemental Figure S3. Related to figure 3.

- (A) ChIP experiment showing Chp1 recruitment to *ssm4* gene.
- (B) ChIP experiment showing that Chp1 recruitment to *ssm4* gene is lost in *mmi1* Δ cells.
- (C) RNA-IP experiment showing that Chp1 and Mmi1 associate to *spo5* and *rec8* mRNAs, in addition to *mei4* and *ssm4* mRNAs.
- (D) ChIP experiment showing no detectable levels of Chp1 on *rec8* gene.

Mmi1 silences protein-coding and noncoding genes accumulating during sexual differentiation

Only four genes have been found to be direct targets of Mmi1. In order to identify in a broad manner RNAs targeted by Mmi1, we carried out a genome-wide transcriptomics analysis of *mmi1* Δ cells. 250 protein-coding genes had their RNA level upregulated at least 1.5 fold in *mmi1* Δ cells (Figure 3A). More than 70% of these genes are induced during sexual differentiation (Figure 3B), confirming the specialized function of Mmi1 towards silencing of

sexual differentiation-specific genes in proliferating cells. Because many noncoding RNAs have been found to be specifically expressed or upregulated during sexual differentiation, we also analyzed their RNA levels in *mmi1Δ* cells. We found noncoding RNAs accumulating significantly in *mmi1Δ* cells. At least 8 of them were previously shown to accumulate during sexual differentiation (Figure 3C), indicating that Mmi1 also silences directly or indirectly expression of noncoding genes in mitotic cells.

Remarkably, the most strongly upregulated gene in our transcriptomics with more than 60 fold increase in *mmi1Δ* cells appeared to originate from *sme2* (Figure 3C), a noncoding gene critical for inhibiting Mmi1-mediated gene silencing during sexual differentiation progression (Harigaya et al., 2006). *sme2* expresses two major forms of noncoding RNA, a short RNA of approximately 500 nucleotides and a longer RNA of around 1600 nucleotides, which we named *smeiRNA* and *lmeiRNA*, respectively. By Northern analysis, we showed that it is the longer form that accumulates preferentially in *mmi1Δ* cells (data not shown). It has been proposed that a *meiRNA* together with Mei2 sexual differentiation activator directly inhibit Mmi1 (Harigaya et al., 2006), we thus tested whether Mmi1 binds to *meiRNA*. RNA-IP experiment showed that *lmeiRNA* is targeted by Mmi1 (Figure 3D). *smeiRNA* shares all of its sequence with *lmeiRNA*, which prevented us from monitoring its binding by Mmi1 in this experiment. However, data on the identification of Mmi1 RNA-binding motifs presented below strongly suggested that *smeiRNA* is not a direct target of Mmi1. Thus, thanks to our transcriptomics approach we identified *lmeiRNA*, as a fifth direct target of Mmi1. Additionally, due to *sme2* function in inhibiting Mmi1, these results highlighted the possible existence of a feedback loop mechanism acting in Mmi1 inhibition process.

Fig3. Vavasseur et al.

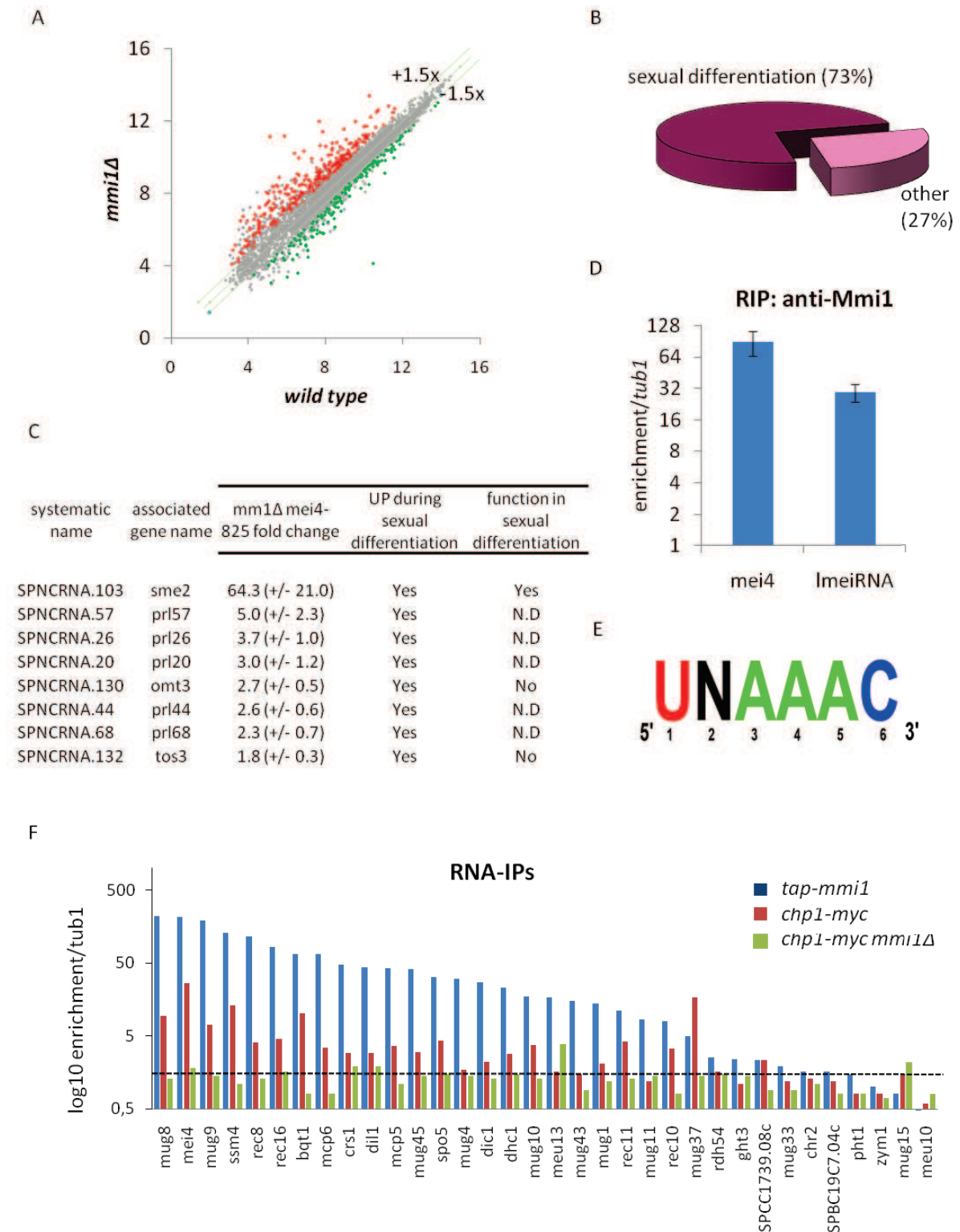


Figure 3. Mmi1 and Chp1 associate to a selective set of sexual differentiation-specific RNAs.

(A) Scatter plot representation of *S. pombe* genome-wide gene expression measured from hybridization signals of RNAs isolated from *mmi1Δ* cells (Y axis) and from a wild type strain (X

axis). Red and green dots represent genes statistically up and down regulated, respectively. Grey dots represent genes not statistically up or down regulated.

- (B) Pie chart of protein coding genes upregulated in *mmi1Δ* cells and during sexual differentiation, according to Mata et al. (Nature Genetics, 2002).
- (C) List of noncoding genes upregulated in *mmi1Δ* cells and previously reported to be upregulated during sexual differentiation (Watanabe et al, Cell, 1994; Kakihara et al, Genes Cells, 2003; Molnar et al, Genetics, 2001).
- (D) RNA-IP showing that the noncoding RNA, lmeiRNA, expressed from *sme2* gene is a target of Mmi1.
- (E) Predicted consensus sequence of Mmi1 RNA-binding motif.
- (F) RNA-IP experiment showing that Mmi1 targets “early” phase-specific RNAs, and that Chp1 targets the same set of RNA in a *mmi1*-dependent manner.

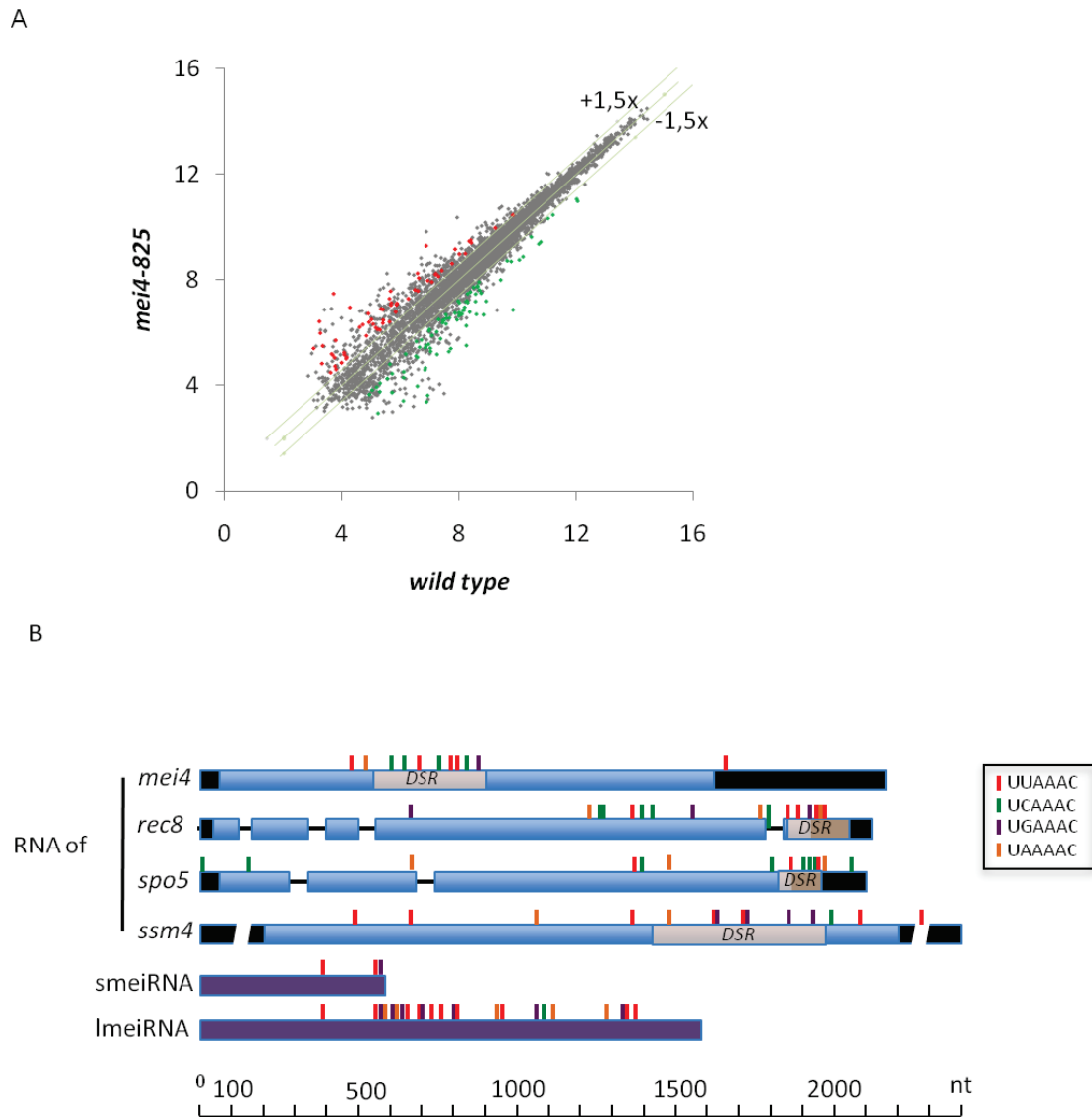
Mmi1 and Chp1 both associate to RNAs accumulating in phase “early” of sexual differentiation

During the course of our study, a detailed analysis of rat Yth521-B protein, the founding member of the YTH family, demonstrated that its YTH RNA-binding module recognizes an hexameric sequence motif, and that Yth521-B protein regulates mRNAs containing clusters of this hexameric motif (Zhang et al., 2010). Using nucleotide sequences of the four known DSR-containing mRNAs (*mei4*, *ssm4*, *spo5*, *rec8*) as well as of lmeiRNA sequence, we search for overrepresented hexameric motifs in these sequences through a bioinformatic approach, described in the Methods section. We found the “UUA AAC” to be highly overrepresented in all five sequences examined but not in any random sequences tested. The “UNAAAC” consensus motif (where N stands for any nucleotide) was also statistically overrepresented (Figure 3E), suggesting that Mmi1 might recognize preferentially “UUA AAC” RNA motif and to a lesser extent to “UGAAAC”, “UCA AAC” and “UAAAAC” motifs. lmeiRNA noncoding RNA had the most “UNAAAC” motifs with a total of 23 over approximately 1600 nucleotides, and *mei4* mRNA the less with 11 motifs present in its sequence (Supplemental Figure S4B).

Among the 250 mRNAs accumulating in *mmi1Δ* cells, we found 17 containing at least 11 “UNAAAC” motifs. Remarkably, 12 of them are upregulated in phase “early” of sexual differentiation, although genes upregulated in this phase account for only around 15 % of all genes upregulated during sexual differentiation, according to Mata et al. classification (Mata et al., 2002). A total of 33 “early” mRNAs accumulated in *mmi1Δ* cells. We choose the naïve

approach of examining Mmi1 binding to all 33 “early” mRNAs, using RNA-IP experiments. 21 of them showed at least a 4 fold enrichment over background after Mmi1 immunoprecipitation (Figure 3F). An analysis of all 21 mRNA sequences indicated that actually less than 11 RNA-binding motifs per RNA is sufficient for recruiting Mmi1, and that very often the Mmi1 RNA-binding motifs are localized in clusters rather than spread out through the transcript sequence (data not shown). We made a refined prediction taking into account the results from our naïve RNA-IP experiment. Among a total of now 27 targets predicted, 21 are expressed from “early” genes, and correspond to the 21 RNA targets validated by our RNA-IP experiment. Noticeably, Mmi1 targets the mRNA encoding for Rep1 (Figure 3F), one of the main transcription factor activating “early” genes, which indicates that through Rep1 silencing Mmi1 might also indirectly inhibit expression of more “early” genes. Thus, thanks to the prediction of Mmi1 targets together with our transcriptomics and RNA-IP experiments, we identified 4 times more Mmi1 RNA targets than previously described (Harigaya et al., 2006). Furthermore, these results point to Mmi1 playing a major role in regulating directly or indirectly a large fraction of the genes involved in phase “early” of sexual differentiation. To assess the extent of overlap between RNAi and Mmi1 targets, we then asked whether RITS might target some of these newly identified Mmi1 targets. Strikingly, Chp1 associates to the vast majority of the targets and this association is dependent on Mmi1 (Figure 3F). These latter results strongly suggest that Mmi1 recruits RITS, directly or indirectly, to all of its RNA targets, which are sexual differentiation-specific genes.

Supplemental Figure S4. Vavasseur et al. Related to figure 3.



Supplemental Figure S4. Related to figure 3.

- (A) Scatter plot representation of *S. pombe* genome-wide gene expression measured from hybridization signals of RNAs isolated from *mei4-825* (y axis) and from a wild type strain (x axis). Red and green dots represent genes statistically up and down regulated, respectively. Grey dots represent genes not statistically up or down regulated.
- (B) Schematic representation of *mei4*, *ssm4*, *spo5*, *rec8* and *sme2* RNAs with the localization of Mmi1 RNA-binding motifs UUA AAC, UCA AAC, UGA AAC and UAA AAC. 5' and 3' UTRs are depicted in black boxes, coding sequences in blue boxes, introns in thin black lanes, and *sme2* noncoding sequence in purple boxes.

RNAi participates in Mmi1-mediated repressive function in sexual differentiation

To address the function of RNAi and Clr4 in Mmi1-mediated repressive function, we analyzed their contribution to Mmi1-mediated gene silencing, as well as to Mmi1-dependent sexual differentiation control. We conducted RT-qPCR experiments on several Mmi1 RNA targets. We found a 2 to 4 fold increase in polyadenylated mRNA, for *mei4*, *ssm4* and *crs1*, in several RNAi deletion mutants and in *clr4Δ* cells (Figure 4A). This increase appeared to be highly specific as the levels of several control RNAs like *cdc2* and *act1* (Figure 4B and data not shown) did not vary significantly under the same conditions. *meiRNA* accumulated more than 10 fold in RNAi and Clr4 deficient cells, and hence further widened the repressive action of RNAi and Clr4 to the silencing of a noncoding gene with an important regulatory function in sexual differentiation (Figure 4B). Intriguingly, we noticed that the extent of RNA accumulation in RNAi and Clr4 deficient cells is always lower when the reverse transcription is done with random hexameric primers instead of an oligo-dT primer (data not shown). This suggests that RNAi and Clr4 might not just act on RNA stability but also on the polyadenylation status of their 3' end, as previously described for Mmi1. In addition, in the same deficient cells, accumulation of polyadenylated mRNA varies from one target gene to another, and can be insignificant in some cases (data not shown). Because redundant processes have been shown to contribute to Mmi1-guided RNA degradation (Saint-André et al., 2010), we believe that for some of Mmi1 targets this redundancy might compensate for the loss of Clr4 and RNAi.

In parallel, we examined whether the reported Mmi1-inhibition of *crs1* premRNA splicing (McPheeters et al., 2009) is impaired in RNAi and Clr4 mutant cells. A splicing assay monitoring the level of *crs1* premRNA and mRNA showed a partial relief of Mmi1-dependent block in *crs1* splicing (Figure 4C). Thus, RNAi and Clr4 might contribute to Mmi1-mediated silencing by acting at different RNA processing steps, namely 3'end processing and splicing. Finally, we also analyzed whether RNAi mutations impact on Mmi1 control of sexual differentiation. It has been proposed that once sexual differentiation is initiated, *meiRNAs* expressed from *sme2* act together with Mei2 protein to inhibit Mmi1-mediated silencing of meiosis-specific genes by sequestering Mmi1 on *sme2* locus (Harigaya et al., 2006). As a consequence, in *sme2Δ* cells Mmi1 is not inhibited, expression of meiosis-specific genes is still silenced, and sexual differentiation arrests. This arrest has been used as a powerful read

out to examine whether a given protein is involved in Mmi1-mediated silencing. Using the *sme2Δ* rescue assay, we checked whether Chp1 and Dcr1 act in Mmi1 silencing pathway. In *dcr1Δ* and *chp1Δ* cells a partial rescue is indeed observed (Figure 4D). From all these results, we concluded that RNAi and Clr4/Suv39h might participate in sexual differentiation control by facilitating Mmi1-mediated gene silencing processes.

Fig4. Vavasseur et al.

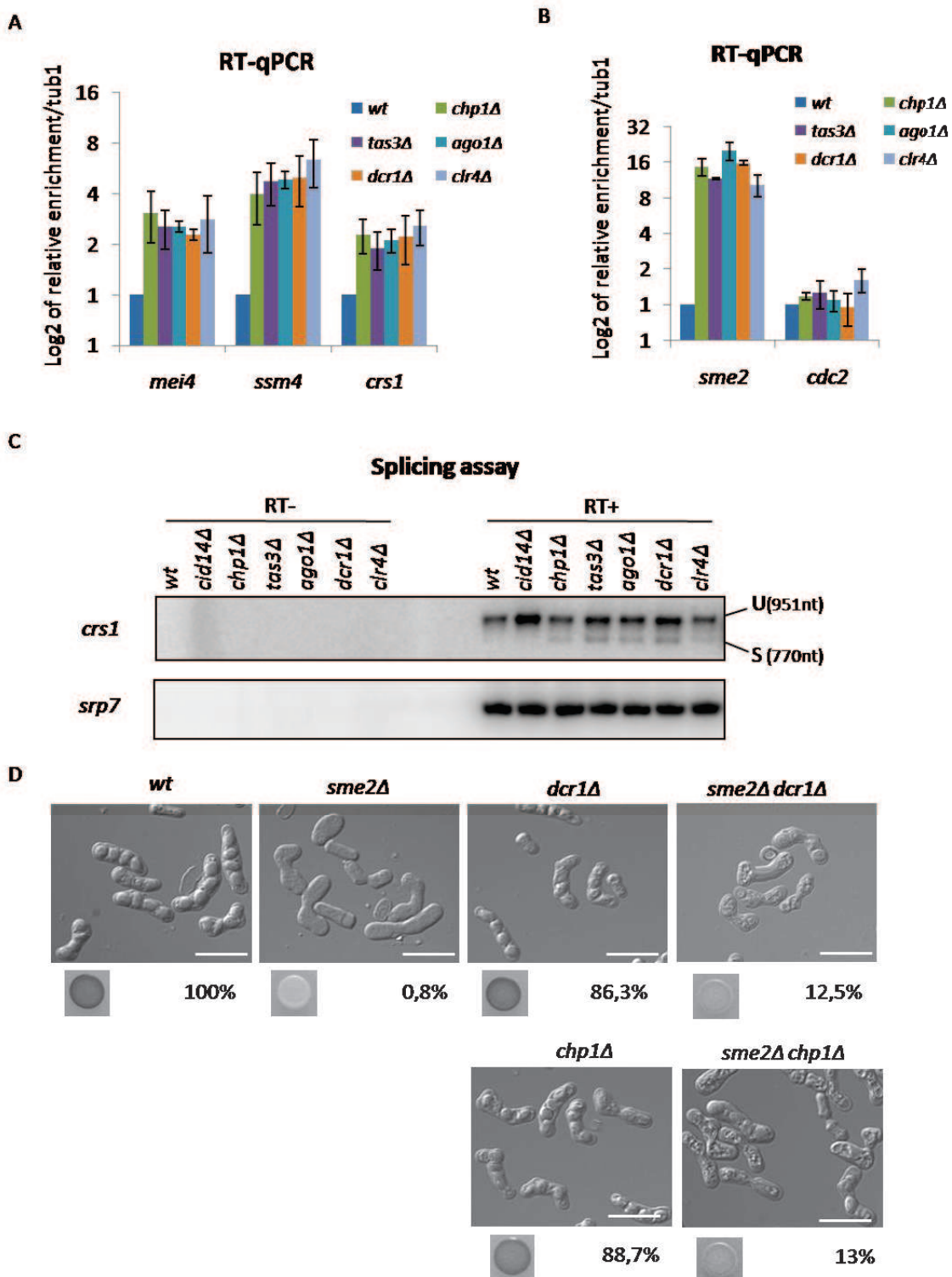


Figure 4. RNAi and Clr4 contribute to Mmi1 repressive function on gene expression and sexual differentiation.

- (A) RT-qPCR analysis showing an increase of *mei4*, *ssm4* and *crs1* polyadenylated mRNAs in *chp1Δ*, *tas3Δ*, *ago1Δ*, *dcr1Δ* and *clr4Δ*.
- (B) RT-qPCR analysis showing an increase of the noncoding polyadenylated lmeiRNA level in the same set of deletion mutants cells as in (A).

- (C) Splicing assay showing that Mmi1-mediated inhibition of *crs1* splicing is less efficient in RNAi mutants.
- (D) Rescue assay showing that *dcr1Δ* and *chp1Δ* mutations partially relieve Mmi1-dependent sexual differentiation arrest in *sme2Δ* cells.

1.4. Contribution de mon travail de thèse aux travaux de l'article

Les travaux que j'ai réalisés au cours de mon doctorat ont permis d'initier ce projet de recherche. Plus précisément, je me suis attachée à identifier les mécanismes impliqués dans le ciblage du RNAi et de RITS à la chromatine et à l'ARN de gènes méiotiques. J'ai mis en évidence l'importance de Mmi1 dans ce ciblage, un résultat majeur nous ayant conduit à la description d'un mode de ciblage inédit pour le RNAi chez *S. pombe*, et à l'identification de nouveaux gènes cibles du RNAi. J'ai également contribué à l'analyse du rôle joué par le RNAi au niveau moléculaire dans la régulation de ces gènes méiotiques.

1.5. Résultats complémentaires à l'article de recherche

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à compléter les différentes données présentées dans l'article de recherche.

Dans un premier temps, je présenterai les résultats obtenus lors de l'analyse plus détaillée des modes de recrutement de RITS au niveau du gène *mei4*.

J'exposerai dans un second temps les données obtenues concernant l'étude du recrutement de RITS au niveau de la chromatine des différents gènes cibles de Mmi1 identifiés par le groupe de M. Yamamoto (Harigaya et al., 2006).

1.5.1. Caractérisation du rôle du promoteur du gène *mei4* dans le recrutement de RITS

Parmi les gènes ciblés par le RNAi, *mei4* revêt un intérêt particulier. Il code pour un facteur de transcription essentiel à la mise en place des divisions méiotiques activant l'expression de près de 500 gènes méiotiques (voir l'introduction). Pour ces raisons, nous avons approfondi l'analyse du mode de recrutement du RNAi au niveau de ce gène. RITS étant recruté sur l'ARN et la chromatine de *mei4*, il est envisageable que le modèle de l'interaction de RITS au niveau de l'hétérochromatine passant par un ARN naissant (Motamedi et al., 2004 ; Buhler et al., 2006) s'applique à *mei4*. Dans l'optique de tester ce modèle, nous avons étudié l'importance des éléments régulateurs présents dans le 5' UTR (Untranslated Region) de l'unité transcriptionnelle du gène *mei4*, et plus particulièrement au promoteur, acteur essentiel de la transcription de ce gène. J'ai dans un premier temps étudié l'effet de la délétion du promoteur de *mei4*, puis l'influence d'une transcription accrue sur le recrutement de RITS sur ce gène.

*1.5.1.1. La transcription du gène *mei4* est nécessaire au recrutement de RITS à la chromatine*

J'ai d'abord éliminé la séquence promotrice potentielle de *mei4* en la remplaçant par un gène de résistance à un antibiotique (Figure 32 A). La séquence de 300 nucléotides (nts-307 à -7 de l'ATG) éliminée inclue à la fois la boîte TATA indispensable pour la transcription,

et les séquences régulatrices FLEX (Horie et al., 1998 ; Abe and Shimoda, 2000). Les souches ainsi obtenues, déficientes pour la région promotrice de *mei4*, ont été notées $\Delta pmei4$.

Dans un premier temps, j'ai vérifié l'effet de cette délétion sur le niveau d'ARN du gène *mei4*.

J'ai tout d'abord analysé le niveau d'ARN global (ARNm sens et ARN antisens) du gène *mei4* ainsi que de deux contrôles : *tub1* (*tubuline 1*), un gène de ménage et *ssm4* (codant pour une protéine s'associant aux microtubules) un gène méiotique dont l'expression serait soumise au même type de régulation par Mmi1 et le RNAi que *mei4*. Les ARN totaux ont été extraits à partir de souches sauvages, et de 2 isolats indépendants de $\Delta pmei4$, et les ARN ont été quantifiés par des expériences de transcription inverses suivies de PCR quantitatives (RT-qPCR). Les résultats montrent que l'élimination du promoteur du gène *mei4* n'affecte pas le niveau d'ARN totaux des deux gènes contrôles mais qu'il induit une diminution d'environ 50% de celui des ARN de *mei4* (Figure 32 B).

En parallèle, nous avons analysé les niveaux d'ARNm de ces gènes dans ces souches en utilisant lors de l'étape de RT des amorces nucléotidiques complémentaires des ARNm (contrairement à l'utilisation d'amorces hexamères aspécifiques lors de la RT-qPCR précédente). A nouveau, nous constatons que les niveaux d'ARNm *mei4* sont réduits de 50% dans les souches $\Delta pmei4$ par rapport à la souche sauvage (Figure 32 C). Cette diminution est spécifique puisque les niveaux d'ARN des gènes contrôles *ssm4* et *tub1* ne sont pas affectés chez les souches $\Delta pmei4$. Ces expériences montrent que comme attendu, la transcription du gène *mei4* est réduite par la délétion de sa région promotrice. Une transcription résiduelle est cependant détectée dans les souches $\Delta pmei4$. Elle pourrait correspondre à la production d'un transcrit de longue taille issu d'un défaut de terminaison de la transcription du gène de résistance utilisé pour la délétion du promoteur *mei4* (Figure 32 A).

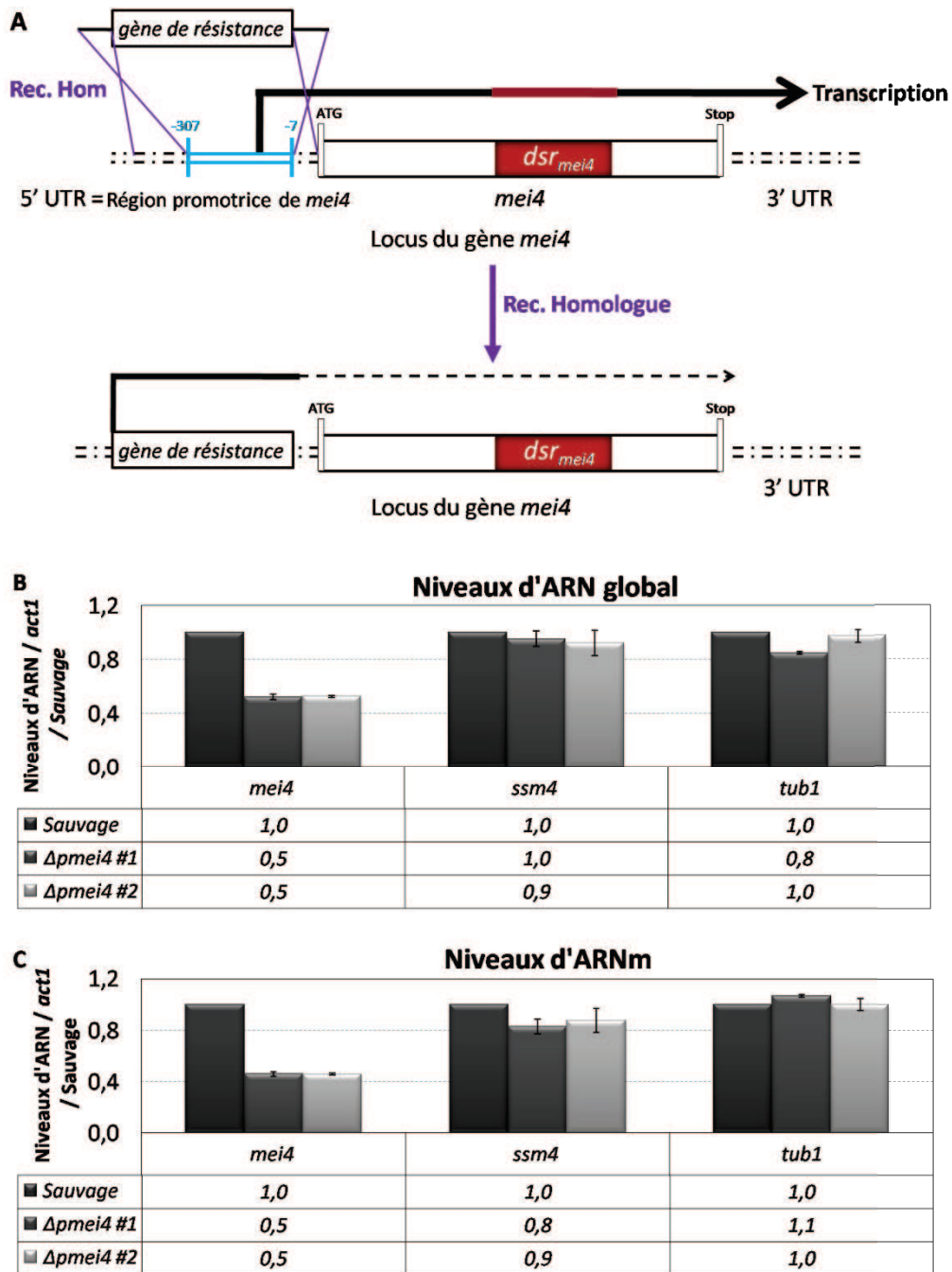


Figure 32. L'élimination de la région promotrice du gène *mei4* induit une diminution du niveau d'ARN. A/ Représentation schématique de la configuration génétique du locus du gène *mei4* dans les souches $\Delta pmei4$, avant et après la délétion. Dans un contexte sauvage, le gène *mei4* (boite blanche), contenant sa séquence DSR (boite rouge) est transcrit (flèche noire et rouge). Les ARN produits s'accumulent modérément (traits noirs et rouges). Après permutation du 5'UTR de *mei4* (doubles traits bleus) avec le gène de résistance (boite blanche « gène de résistance »), par recombinaison homologue (croix violettes), la transcription serait inactivée, et le niveau d'ARN de *mei4* diminue. B/ Analyse par RT-qPCR du niveau d'ARN global (panneau supérieur) ou C/ brin sens (=ARNm) spécifique, provenant des gènes *mei4* (amorces nucléotidiques PV180/181), *ssm4* (PV182/183) et *tub1* (PV176/177). Les niveaux d'ARN présents dans deux isolats génétiques différents de la souche $\Delta pmei4$ (isolat #1 et 2 = SPV 1199 et 1200) sont quantifiés relativement au niveau d'ARN contrôle

act1 (PV174/175), et de la souche sauvage (SPV13). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne calculée pour deux expériences de RT-qPCR réalisées sur la même préparation d'ARN, et les barres d'erreur représentent l'écart moyen (SD).

Dans un deuxième temps, j'ai analysé le recrutement du complexe RITS à la chromatine du gène *mei4* en l'absence de son promoteur, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Les ChIP ont été effectuées sur une souche *chp1-tap* exprimant la sous-unité de RITS Chp1 fusionnée en sa partie C-terminale (C-ter) à une étiquette TAP (Tandem Affinity Purification), à partir du locus *chp1*, et sur une souche sauvage non étiquetée permettant de contrôler le bruit de fond de l'expérience. Les souches *chp1-tap* portent soit le gène *mei4* sauvage (souche *chp1-tap*), soit le gène *mei4* déficient pour sa région promotrice (souche *chp1-tap Δpmei4*).

Les enrichissements moyens montrent comme attendu le recrutement de Chp1-TAP à la chromatine des gènes *mei4*, *ssm4*, et de la région *dg otr1* dans la souche *chp1-tap* (Figure 33 A et B). De plus, le niveau de recrutement de Chp1-TAP aux loci *ssm4* et *dg otr1* n'est pas impacté dans la souche *chp1-tap Δpmei4*. En revanche, la délétion du promoteur de *mei4* induit une perte d'environ 60% de Chp1 à la chromatine de *mei4* par rapport à la souche contrôle *chp1-tap*. L'absence de perte totale pourrait être expliquée par la transcription résiduelle du gène *mei4* détectée par RT-qPCR (Figure 32 B).

Ces résultats suggèrent fortement que la transcription est requise pour le recrutement correct de Chp1 à la chromatine de ce gène. Ceci est en faveur du modèle de l'association de RITS à la chromatine par l'intermédiaire d'un ARN en cours de transcription qui servirait de plateforme de recrutement. Ce modèle est appuyé par l'ensemble des résultats supplémentaires présentés dans les paragraphes 1.5.1.2. ; 2.2 et 2.3.

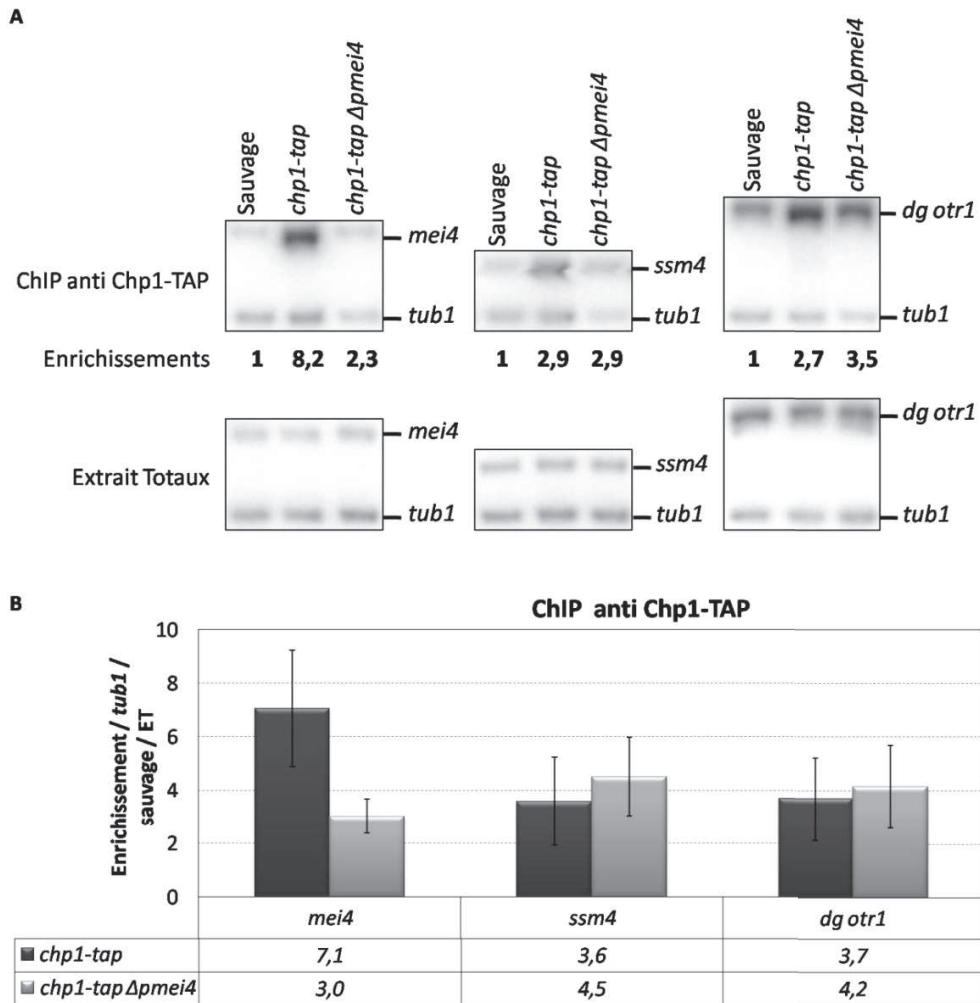


Figure 33 : L'absence de la région promotrice du gène *mei4* induit la perte partielle de Chp1 à la chromatine de ce gène. A/ Analyse par ChIP anti-TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine dans les souches *chp1-tap* (SPV13) et *chp1-tap Δpmei4* (SPV1199). Les ChIP ont été réalisées en immunoprécipitant la protéine Chp1-TAP, puis en quantifiant les niveaux d'ADN de différents loci potentiellement associés à Chp1, les gènes *mei4* (amorces nucléotidiques PV114/115) et *ssm4* (PV60/61) et la région péri-centromérique *dg otr1* (PV150/151), relativement au niveau d'ADN du gène contrôle *tub1* (PV74/75) qui n'est pas associé à Chp1. Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* normalisés par rapport aux signaux obtenus dans les extraits totaux (ET) puis à la souche sauvage (SPV8). **B/** Moyenne des résultats obtenus suite aux analyses par ChIP α-TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine des gènes de **A/** Les valeurs représentent la moyenne des enrichissements obtenus pour 5 ChIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) correspondants.

1.5.1.2. La surexpression du gène *mei4* perturbe le recrutement de Chp1

Afin de confirmer l'importance de la transcription dans le recrutement de RITS à la chromatine de *mei4*, j'ai construit des souches *chp1-tap p3nmt1-me4*, pour lesquelles le

promoteur de ce gène a été remplacé par le promoteur fort p3nmt1 (Maundrell, 1990) à partir de souches exprimant le gène *chp1-tap*. En l'absence de thiamine dans le milieu de culture, l'activité transcriptionnelle de ce promoteur est maximale, et celle-ci diminue lorsque la concentration en thiamine augmente dans le milieu permettant ainsi de moduler l'expression d'un gène à façon.

J'ai d'abord vérifié la fonctionnalité de cette construction en réalisant des RT-qPCR à partir des ARN extraits d'une souche *chp1-tap* sauvage pour *mei4* et de trois isolats indépendants des souches *chp1-tap p3nmt1-me4*, cultivées en dans un milieu supplémenté ou non en thiamine. Même en absence d'induction du promoteur (« + thiamine »), une augmentation d'un facteur 6 du niveau des ARN de *mei4* a été détectée dans les souches *chp1-tap p3nmt1-me4* relativement à la souche *chp1-tap* (Figure 34, 1^{ère} barre d'histogramme). L'activation maximale du promoteur en l'absence de thiamine, augmente le niveau d'ARN de *mei4*, d'un facteur 20 (Figure 34, 2^{ème} barre d'histogramme). La surexpression du gène *mei4* par le promoteur fort p3nmt1 induit donc bien une forte accumulation des ARN de *mei4*, qui échapperaient ainsi aux différents mécanismes contrôlant l'expression de ce gène.

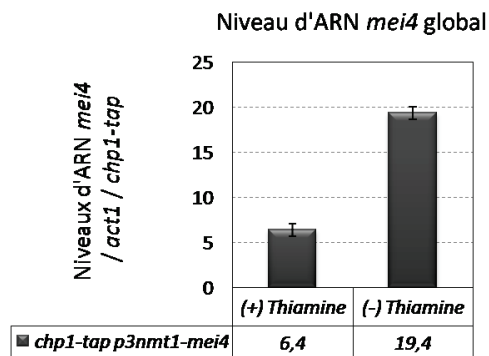


Figure 34. Le promoteur fort p3nmt1 induit la surexpression du gène *mei4*. Analyse par RT-qPCR du niveau d'ARN global provenant du gène *mei4* (amorces nucléotidiques PV180/181) quantifiés relativement au niveau d'ARN contrôle *act1* (PV174/175). Les ARN ont été extraits des différentes souches cultivées dans un milieu dépourvu de thiamine (Emmc) dans lequel le promoteur est non induit, ou dans un milieu YES contenant de la thiamine, dans lequel le promoteur p3nmt1 est induit. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des niveaux d'ARN obtenus pour les trois isolats génétiques de la souche *chp1-tap p3nmt1-me4* (SPV932 et 933 et 934) relativement à la souche sauvage *chp1-tap* (SPV13), calculée à partir d'une expérience de RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent l'écart moyen (SD).

J'ai ensuite testé l'effet d'une surexpression modérée du gène *mei4* sur la localisation de Chp1 au niveau de la chromatine de ce gène, par CHIP dans les souches *chp1-tap p3nmt1-me4* cultivées en présence de thiamine. De manière surprenante, les résultats révèlent que Chp1 n'est quasiment plus recrutée à la chromatine du gène *mei4* lorsque celui-ci est sous le contrôle du promoteur *p3nmt1*, alors que Chp1 est toujours bien associée à la chromatine des loci contrôles *ssm4* et *dg otr1* (Figure 35 A et B).

Deux explications pourraient rendre compte de ce résultat. Une séquence particulière, présente dans le promoteur endogène, pourrait être importante pour le recrutement de Chp1. Une deuxième hypothèse serait que la surexpression du gène conduit à une saturation des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de ce gène, tel que le système Mmi1, comme cela a été suggéré par les données de M. Yamamoto (Harigaya et al., 2006). On pourrait supposer que dans cette situation de surexpression de *mei4*, l'interaction de Mmi1 avec son ARN cible est perturbée par l'excès d'ARN. Mmi1 étant essentiel pour le recrutement de RITS (Figure 2 de l'article de recherche), cette interférence occasionnerait la perte de Chp1. Dans cette deuxième hypothèse, la force du promoteur serait importante pour un bon recrutement de Chp1 à la chromatine (Figure 35 A et B). Les données supplémentaires présentées dans les paragraphes 2.2 et 2.3 permettent de confirmer cette deuxième hypothèse.

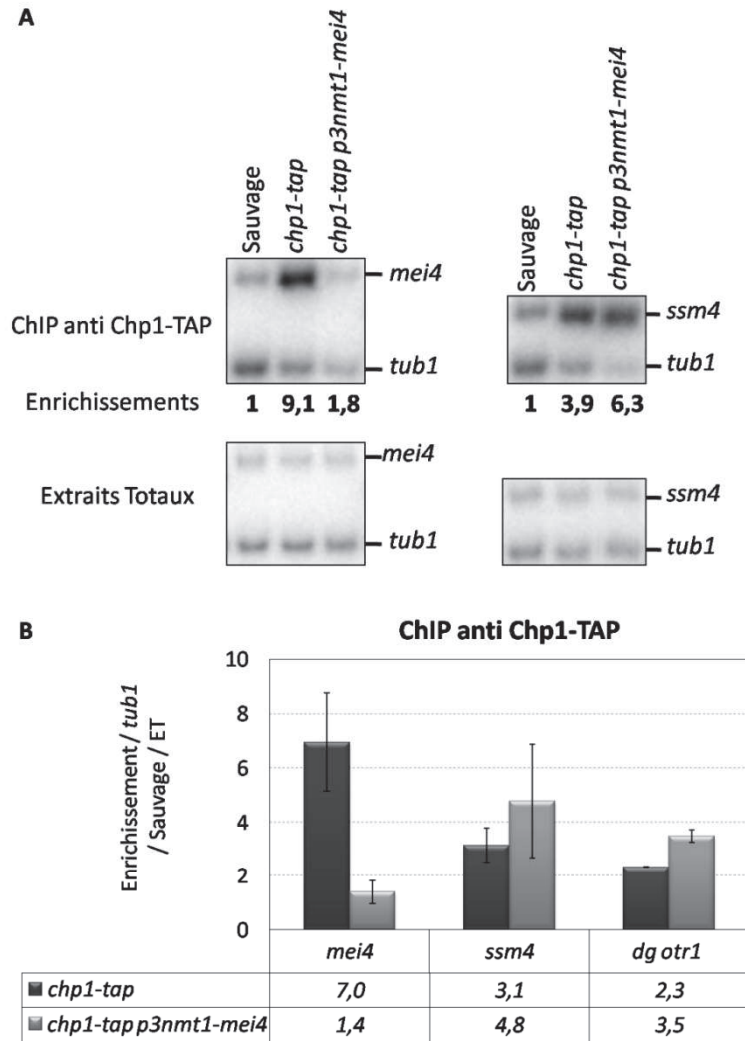


Figure 35. La surexpression du gène *mei4* perturbe l'association de Chp1 à la chromatine. A/ Analyse par ChIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine de *mei4* (Amorces nucléotidiques PV114/115) et *ssm4* (PV60/61) dans les souches *chp1-tap* (SPV13) et *chp1-tap p3nmt1mei4* (SPV932). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV74/75), aux extraits totaux (ET), et à la souche sauvage (SPV8). **B/** Moyenne des résultats obtenus suite aux analyses par ChIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine des gènes de **A/** et *dg otr1* (PV256/257). Les valeurs représentent la moyenne des enrichissements obtenus pour 3 ChIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) correspondants.

Afin de déterminer si la surexpression du gène *mei4* affecte l'association de Chp1 à l'ARN ou uniquement l'interaction à la chromatine, j'ai analysé le recrutement de Chp1 à l'ARN de *mei4* dans la souche *chp1-tap* sauvage pour le gène *mei4*, à la souche *chp1-tap p3nmt1-mei4*, par immunoprécipitation de l'ARN (RIP). Cette technique proche de la ChIP permet la détection des ARN associés à une protéine. Les résultats obtenus pour les RIP anti-TAP effectuées dans les souches exprimant *chp1-tap p3nmt1-mei4* indiquent que Chp1 n'est

plus capable d'interagir avec l'ARN de *mei4* lorsque le gène est modérément surexprimé, de la même façon qu'à la chromatine (Figure 36).

Nous pouvons conclure suite à ces résultats que l'association de Chp1 à la chromatine ainsi qu'à l'ARN du gène *mei4* est sensible au niveau de transcription de ce gène. Les recherches mériteraient d'être approfondies afin de confirmer l'hypothèse de saturation du mécanisme dépendant de Mmi1 conduisant à la déstabilisation de l'association de Chp1 à l'ARN de *mei4*. Un contrôle intéressant consisterait à vérifier l'interaction de Mmi1 avec cet ARN, par RIP.

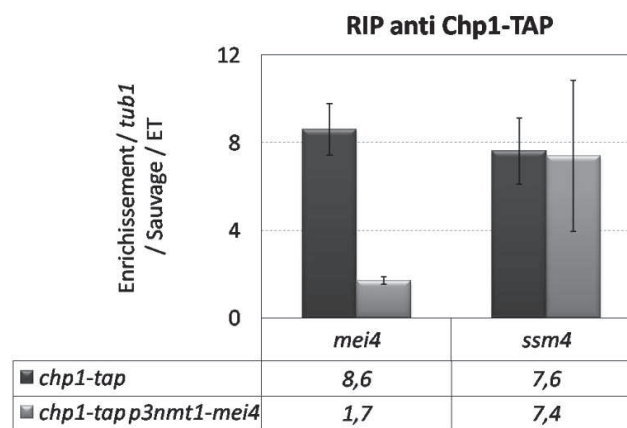


Figure 36. La surexpression du gène *mei4* perturbe l'association de Chp1 à l'ARN. Analyse par RIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur l'ARN de *mei4* (PV180/181); et *ssm4* (PV182/183); dans les mêmes souches que la figure 35. Les enrichissements sont calculés relativement à l'ARN contrôle *tub1* (PV176/177), et à la souche sauvage (SPV8). Les valeurs correspondent à la moyenne des enrichissements obtenus pour 2 RIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) associés.

Les résultats présentés dans ce paragraphe suggèrent que la transcription du gène *mei4* joue un rôle essentiel dans le recrutement de Chp1, et donc du complexe RITS, au niveau de la chromatine et de l'ARN de ce gène.

1.5.2. Identification de gènes codants ciblés par le RNAi

Les résultats présentés dans l'article de recherche montrent d'une part que Chp1 interagit avec tous les ARN ciblés directement par Mmi1, et d'autre part que Mmi1 est

indispensable au recrutement de Chp1 sur ces mêmes ARN (Figure 3F). Parmi les ARN ainsi testés, nous retrouvons une partie des ARN précédemment identifiés par le groupe de M. Yamamoto comme des cibles potentielles de Mmi1 : *mei4*, *ssm4*, *mug9*, *mug1*, *crs1*, *rec8*, *spo5*, *bqt1* et *dil1* (Harigaya et al., 2006). Nos résultats de RIP permettent ainsi de confirmer ces huit ARN comme des cibles directes de Mmi1 et Chp1 (Figure 3F de l'article). Afin de déterminer si les gènes produisant ces ARN sont également ciblés par Mmi1 et Chp1 à la chromatine, j'ai complété cette analyse par des expériences de CHIP. Pour cela, j'ai analysé le recrutement de Mmi1 (souche *tap-mmi1*) et de Chp1 (souche *chp1-tap*), sur les douze gènes méiotiques codants identifiés par le groupe de M. Yamamoto (Harigaya et al., 2006) : les neuf testés en RIP (voir ci-dessus) additionnés de *meu26*, *meu1* et *rec25* (Figure 37 A).

Les CHIP réalisées en immunoprécipitant la protéine Mmi1 étiquetée à son extrémité N-ter avec le peptide TAP (souche *tap-mmi1*) révèlent que Mmi1 est enrichie sur la chromatine d'une partie seulement des gènes testés, en plus de *mei4* et *ssm4* : les gènes *mug9*, *meu26*, *mug1*, et *crs1* (en gris clair sur la Figure 37 B, et données non présentée pour *rec25*). Les enrichissements moyens de Mmi1 obtenus pour les gènes *meu26* (x3,6) et *crs1* (x5,9) sont proches de ceux obtenus pour *ssm4* (x4,4) et ils sont un peu plus faibles pour *mug9* (x2,8). L'enrichissement obtenu pour *mug1* est faible (x1,7), mais reproductible (confirmé par quatre CHIP indépendantes). Aucun enrichissement significatif n'a pu être mis en évidence sur la chromatine des gènes *rec8*, *spo5*, *bqt1*, *dil1*, *meu1* et *rec25*. La comparaison des valeurs des enrichissements obtenues pour l'association de Mmi1 à la chromatine avec celles obtenues en RIP (Figure 3F de l'article) ne semble pas indiquer une corrélation entre une association forte de Mmi1 à l'ARN (potentiellement suggérée par des enrichissements élevés) et une association à la chromatine. Ce résultat, associé à ceux de la Figure 3F de l'article de recherche, met en évidence une différence de comportement de Mmi1 selon les gènes ciblés : certains seraient ciblés à la fois sur leur chromatine et sur les ARN, alors que d'autres ne le seraient que sur leurs ARN.

Les CHIP réalisées contre la protéine Chp1-TAP montrent que celle-ci serait enrichie sur la chromatine d'un seul des ces gènes, en plus de *mei4* et *ssm4*, le gène *mug9* (en noir sur la Figure 37 B). Ainsi, tous les gènes dont la chromatine est ciblée par Chp1 (*mei4*, *ssm4*, et *mug9*) le sont aussi par Mmi1. Cependant la réciproque n'est pas vraie : Mmi1 serait capable de s'associer à la chromatine de gènes non ciblés par Chp1 (*meu26*, *crs1* et *mug1*). Les résultats de RIP présentés dans l'article de recherche montrent en revanche que la présence

de Mmi1 sur un ARN corrèle toujours avec celle de Chp1 (Figure 3F). Cette différence de comportement de Chp1 suggère que des éléments additionnels à Mmi1 pourraient être requis pour un recrutement stable de Chp1 à la chromatine de certains gènes.

L'HMT Clr4 qui dépose la méthylation d'H3K9, une marque de l'hétérochromatine constitutive, étant requise pour l'interaction stable de Chp1 avec la chromatine du gène *mei4* (Figure 1 de l'article de recherche), j'ai étudié la corrélation entre la présence de cette marque et celle de Mmi1 et Chp1 à la chromatine. Pour cela, j'ai analysé la présence de H3K9me2 sur la chromatine de ces différents gènes cibles de Mmi1 par ChIP, en utilisant un anticorps spécifique de cette marque. Les résultats montrent que la chromatine des gènes ciblés par Mmi1, *mei4*, *ssm4*, *mug1* et *mug9*, présentent tous la marque H3k9me2, à l'exception de *meu26* et *crs1* (Figure 2E de l'article, et Figure 37 C, en noir). Cette marque est également enrichie sur la chromatine du gène *meu1*, non ciblé par Mmi1 à la chromatine.

Comme la présence de la méthylation H3k9me2 sur la chromatine des gènes *mei4* et *ssm4* dépend de la protéine Mmi1 (Figure 2E de l'article), j'ai vérifié l'existence de cette dépendance pour ces différents gènes, en effectuant une ChIP contre H3K9me2 dans une souche $\Delta mmi1$. Les résultats de ces ChIP révèlent que cette marque est totalement absente de la chromatine de *mei4*, *ssm4*, *mug9*, et *mug1* dans une souche $\Delta mmi1$, à la différence de *meu1*, pour lequel la délétion de Mmi1 n'affecte que partiellement cette marque (Figure 37 C en gris clair). Ces différentes données suggèrent qu'à l'exception de *meu1*, la méthylation d'H3K9 serait établie spécifiquement sur la chromatine des gènes ciblés par Mmi1, et de manière dépendante de celle-ci. Un mécanisme de régulation supplémentaire, partiellement indépendant de Mmi1, pourrait être mis en jeu au niveau du gène *meu1*. Cette particularité est discutée de manière plus détaillée dans la partie Discussion de ce manuscrit.

A

Nom gène	Identification de l'ORF	Fonction	Classification
<i>mei4</i>	SPBC32H8.11	Facteur de transcription	Intermédiaire
<i>ssm4</i>	SPAC27D7.13c/SPAC637.01	Protéine associée aux microtubules nucléaires	Précoce
<i>mug9</i>	SPCC70.09c	-	Précoce
<i>meu26</i>	SPAC6B12.16	-	Intermédiaire
<i>mug1</i>	SPCC11E10.03	Sous-unité complexe dynactine	Précoce
<i>crs1</i>	SPBC2G2.09c	Cycline	Précoce
<i>rec8</i>	SPBC29A10.14	Sous-unité cohésine	Précoce
<i>spo5</i>	SPBC29A10.02/SPBC365.18	Protéine de liaison à l'ARN	Précoce
<i>bqt1</i>	SPAC6G9.13c	Sous-unité bouquet télomères	Précoce
<i>dil1</i>	SPAC458.04c	Sous-unité dynéine	Précoce
<i>meu1</i>	SPAC1556.06	Gène orphelin	Intermédiaire
<i>rec25</i>	SPAC17A5.18c	Ségrégation des chromosomes/Recombinaison	Précoce

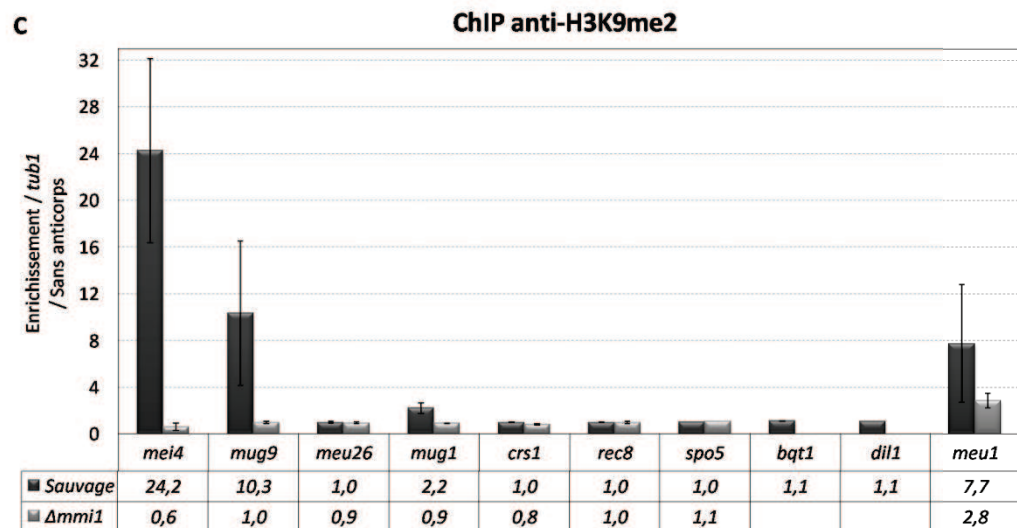
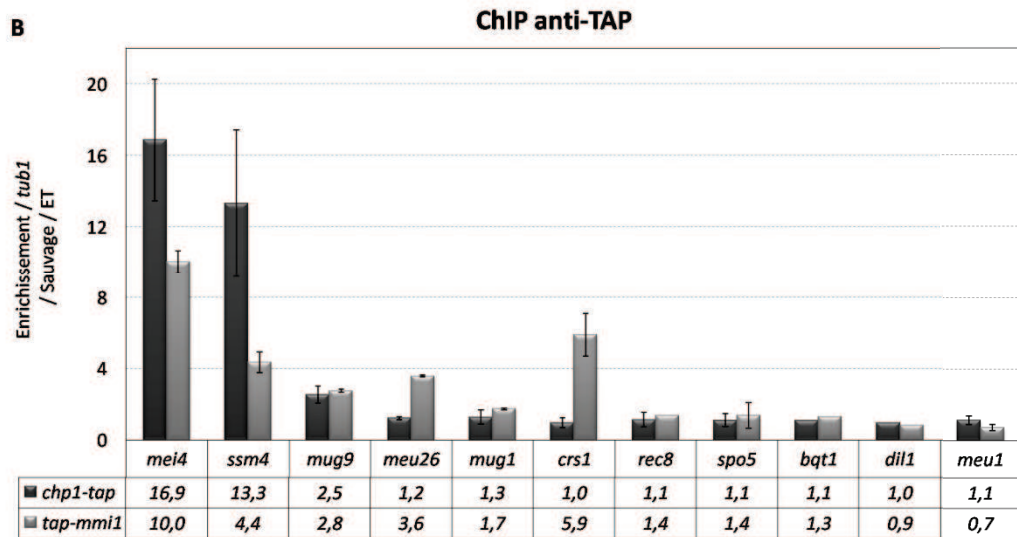


Figure 37. L'association de Chp1 et de la marque H3K9me2 à la chromatine dépend de Mmi1. A/ Table des gènes codants méiotiques identifiés comme des cibles potentielles de Mmi1 par les travaux d'Harigaya *et al.* publiés en 2006. **B/** Analyse du recrutement de Chp1-TAP et de TAP-Mmi1 à la

chromatine des gènes de la table **A** par CHIP anti-TAP suivie de qPCR, dans les souches sauvage (SPV8) *chp1-tap* (SPV13) et *tap-mmi1* (SPV546). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV176/177), et à la souche sauvage. Le graphe représente la moyenne des résultats obtenus suite à deux analyses CHIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) correspondants. **C/** Analyse de la présence de la marque H3K9me2 à la chromatine des gènes de la table **A** par CHIP α -H3K9me2 dans les souches sauvage (SPV8) et Δ *mmi1* (SPV1819). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV176/177), et à l'échantillon sans anticorps. Les CHIP présentées ici ont été analysées par qPCR plutôt que par PCR semi-quantitative, cette méthode s'étant révélée plus sensible. Amorces nucléotidiques utilisées pour l'analyse en qPCR : *mei4* (PV180/181); *ssm4* (PV182/183); *meu26* PV997/998 ; *crs1* : PV 497/498 ; *mug9* : PV 1103/1104 ; *meu1* : PV995/996 ; *rec8* : PV794/795 ; *bqt1* : PV1363/1364 ; *dil1* PV1369/1370 ; *mug1* : PV999/1000 ; *spo5* PV792/793.

Chapitre II

Caractérisation du rôle de Mmi1 dans le recrutement de Chp1

Le gène *mei4* contient une séquence particulière appelée DSR (Determinant of Selective Removal) importante pour la régulation de l'expression de ce gène au niveau post-transcriptionnel, par la protéine Mmi1 (Harigaya et al., 2006). Dans le chapitre précédent de ce manuscrit, nous démontrons que cette séquence est également essentielle pour le ciblage d'un autre complexe régulateur, le complexe effecteur du RNAi, RITS. RITS cible le gène *mei4* à la fois au niveau de son ARN, et de sa chromatine. Grâce à ce ciblage, le RNAi serait impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de ce gène. Les données présentées dans l'article montrent par ailleurs que la protéine Mmi1 est indispensable pour le recrutement de RITS sur ce gène : sans la séquence DSR, ou sans Mmi1, la sous-unité Chp1 du complexe RITS ne s'associe ni à la chromatine ni à l'ARN du gène *mei4*.

D'après la littérature, la spécificité du ciblage de RITS serait essentiellement déterminée par la séquence des petits ARN chargés dans la sous-unité Ago1. Cependant, l'ensemble des résultats acquis durant ce travail permet d'envisager un mode de recrutement alternatif de RITS sur ses gènes cibles. En effet, il est intéressant de considérer Mmi1 comme un élément initiateur du recrutement spécifique de RITS sur ses cibles.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai premièrement tenté de montrer si la seule présence de Mmi1 sur un gène pouvait être suffisante pour induire le recrutement de RITS. En parallèle, j'ai analysé si la seule présence de la séquence DSR du gène *mei4* pouvait suffire à induire le recrutement de RITS sur un gène.

2.1. Mmi1 est-elle suffisante pour recruter RITS à un ARN ?

2.1.1. Mise en place d'un système rapporteur permettant de cibler Mmi1 à un ARN

La première stratégie que nous avons mise en place afin d'évaluer la capacité de Mmi1 à recruter RITS sur un ARN a consisté à induire de manière artificielle l'association de Mmi1 à un ARN rapporteur, puis vérifier la présence ou non de RITS sur cet ARN. Nous avons utilisé pour cela un outil dont l'efficacité a déjà été démontrée chez *S. pombe* (Buhler et al., 2006) : le système λ N. Ce système est basé sur l'interaction spécifique et à haute affinité de la protéine N du phage λ (nommée par la suite protéine λ N) avec la séquence BoxB (séquence de 19nts formant une épingle à cheveu) d'un ARN (Mogridge et al., 1995). La protéine λ N est un petit peptide de 25 acides aminés seulement qui est capable d'induire le recrutement d'une protéine nucléaire qui lui est fusionnée sur un ARN contenant la séquence BoxB (Baron-Benhamou et al., 2004). Ainsi, ce système a le potentiel d'induire le ciblage artificiel de la protéine chimère λ N-Mmi1 à un ARN rapporteur contenant la séquence BoxB (Figure 38 A).

J'ai généré des souches (*ura4-5BoxB λ N-mmi1*) exprimant sous le contrôle du promoteur fort p3nmt1 la protéine chimère λ N fusionnée à l'extrémité N-ter de Mmi1 (au niveau du locus endogène du gène *mmi1*), à partir d'une souche portant le gène rapporteur *ura4* contenant cinq sites BoxB successifs à son extrémité 3' UTR (souche *ura4-5BoxB*, fournie par D. Moazed, Figure 38 A). L'utilisation du gène *ura4-5BoxB* présente un double intérêt dans notre système: il nous permet en effet de tester le recrutement de RITS par λ N-Mmi1 au niveau de la chromatine et de l'ARN du gène rapporteur *ura4-5BoxB*. Il permet aussi de tester directement le niveau de « silencing » de ce gène provoqué par la présence de λ N-Mmi1 sur cet ARN. En effet, selon notre hypothèse, la protéine chimère λ N-Mmi1 devrait être recrutée sur un site BoxB présent sur l'ARN *ura4-5BoxB* par l'intermédiaire du peptide λ N (Figure 38 A). Une fois associée à cet ARN, Mmi1 pourrait mettre en place le « silencing » post-transcriptionnel de la même façon que pour ses cibles naturelles.

Outre la souche *ura4-5BoxB λ N-mmi1*, j'ai également utilisé deux souches contrôles (fournies par D. Moazed). La première exprime à la fois le gène rapporteur *ura4-5BoxB* et la protéine chimère λ N-GFP (*ura4-5BoxB λ N-gfp*) et permet de vérifier l'expression correcte du gène rapporteur sur les différents milieux. La deuxième exprime la protéine chimère Tas3- λ N

qui doit induire le « silencing » du gène *ura4-5BoxB*, comme cela a déjà été démontré (Buhler et al., 2006). De cette façon, la souche exprimant à la fois les gènes *ura4-5BoxB* et *tas3-λN* permet de comparer le « silencing » établi par Tas3-λN à celui éventuellement induit par λN-Mmi1. Enfin, l'utilisation d'une troisième souche contrôle n'exprimant que le gène rapporteur *ura4-5BoxB* permet de vérifier les effets liés à cette seule construction.

J'ai vérifié en premier lieu si l'association de λN-Mmi1 à l'ARN rapporteur *ura4-5BoxB* permet l'induction du « silencing » de l'expression du gène *ura4-5BoxB*. Pour cela, j'ai réalisé des tests permettant de jauger le niveau de « silencing » du gène *ura4-5BoxB*. Ces tests classiques chez la levure, sont basés sur l'utilisation du 5FOA (5-fluoro-orotique) transformé en composé toxique par les cellules exprimant le gène *ura4* (voir la partie « Matériels et méthodes » de ce manuscrit pour plus de détails).

Nous avons ainsi testé le « silencing » pour ces différentes souches contrôles et plusieurs isolats génétiques de la souche *ura4-5BoxB λN-mmi1*. Ces différents souches ne présentent pas de défaut de pousse sur le milieu contrôle (Figure 38 B). La souche *ura4-5BoxB* se développe correctement sur le milieu dépourvu en uracile, mais pas sur le milieu contenant du 5FOA, indiquant que le gène *ura4-5BoxB* s'exprime correctement. Le léger défaut de croissance observé pour les souches *ura4-5BoxB λN-gfp* sur le milieu dépourvu en uracile suggère que le recrutement de la protéine λN-GFP perturbe partiellement l'expression du gène *ura4-5BoxB* (comparer la pousse des souches *ura4-5BoxB* et *ura4-5BoxB λN-gfp* sur le milieu –ura, Figure 38 B). Cependant, la souche *ura4-5BoxB λN-gfp* ne se développe pas sur le milieu 5FOA, indiquant l'absence d'un « silencing » suffisant du gène *ura4-5BoxB*. A l'inverse, la souche contrôle *ura4-5BoxB tas3-λN* se développe correctement sur tous les milieux, révélant la mise en place d'un « silencing » du gène *ura4-5BoxB* qui s'adapte aux conditions du milieu de culture. Enfin, les souches exprimant la protéine fusion λN-Mmi1 et le gène *ura4-5BoxB* se développent au même niveau que les souches *ura4-5BoxB tas3-λN* sur le milieu contenant du 5FOA, et éprouvent des difficultés à se développer en l'absence d'uracile (Figure 38 B). Ce résultat reflète la mise en place du « silencing » du gène *ura4-5BoxB* dans les souches *ura4-5BoxB λN-mmi1*, suite à l'ancrage de λN-Mmi1 sur l'ARN de ce gène.

L'ensemble de ces résultats suggère que la fusion du peptide λN à la protéine Mmi1 provoque le recrutement de Mmi1 sur l'ARN *ura4-5BoxB*, et que la protéine fusion λN -Mmi1 est capable d'induire le « silencing » de ce gène (Figure 38 B).

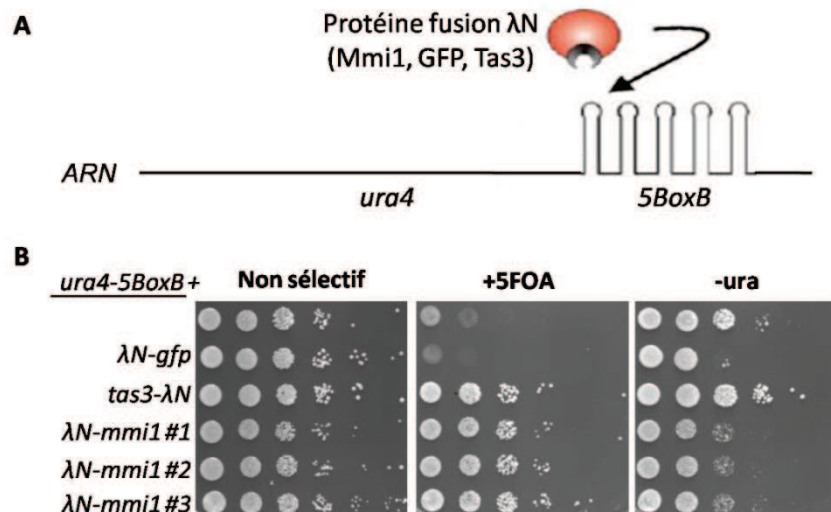


Figure 38. Le recrutement artificiel de la protéine Mmi1 sur un ARN suffit pour induire le « silencing ». **A/** Représentation schématique du ciblage d'un ARN *ura4-5BoxB* par une protéine fusion λN . L'ARN *ura4-5BoxB* est issu de la transcription du gène *ura4* endogène pour lequel le 3'UTR endogène a été remplacé par 5 séquences BoxB (épingles à cheveu sur l'ARN). Cet ARN est ciblé par la protéine (cercle rouge) fusionnée au peptide λN (crochet gris). Adapté de Buhler et al., 2006. **B/** Le recrutement artificiel de Mmi1 à un ARN suffit pour induire le « silencing » de son expression. Test de « silencing » sur les souches *ura4-5BoxB* (SPV912); *ura4-5BoxB* λN -*gfp* (SPV914), *ura4-5BoxB* *tas3*- λN (SPV913); *ura4-5BoxB* λN -*mmi1* isolats #1; 2 et 3 (SPV 1038; 1039 et 1040). Dans ces tests, nous avons déposé une quantité identique de cellules sur un milieu contrôle Emmc (non sélectif), sur un milieu Emmc contenant du 5FOA (+5FOA), ou un milieu Emmc-*ura* dans lequel l'uracile est absent (-*ura*). La capacité de pousser des cellules est comparée d'un milieu à l'autre, afin d'évaluer le niveau d'expression du gène *ura4* (voir la partie « Matériels et méthodes » de ce manuscrit pour plus de détails).

2.1.2. Interaction entre le système rapporteur λN -Mmi1 / *ura4-5BoxB* et le RNAi

Afin d'étudier l'implication des mécanismes du RNAi ou de l'hétérochromatine dans le « silencing » du gène *ura4-5BoxB* induit par λN -Mmi1, nous avons construit des souches exprimant le gène *ura4-5BoxB* et la protéine λN -Mmi1 dans un fond génétique déficient pour Dcr1 ($\Delta dcr1$) ou pour Clr4 ($\Delta clr4$). En l'absence de la ribonucléase Dcr1 les siARN ne sont plus produits, et la structure d'hétérochromatine aux péricentromères est perdue. Dans

les souches $\Delta clr4$ déficientes en activité H3K9-méthyltransférase, la marque H3K9me est totalement absente du génome et toutes les régions d'hétérochromatine constitutive sont affectées. Les tests de « silencing » effectués dans ces souches montrent que, d'une manière surprenante, le « silencing » du gène *ura4-5BoxB* par λN -Mmi1 est aussi efficace en présence ou en l'absence de *Dcr1* ou *Clr4* (Figure 39). Ces résultats suggèrent que le « silencing » du gène *ura4-5BoxB* par λN -Mmi1 pourrait être indépendant à la fois de la voie du RNAi et de la méthylation H3K9.

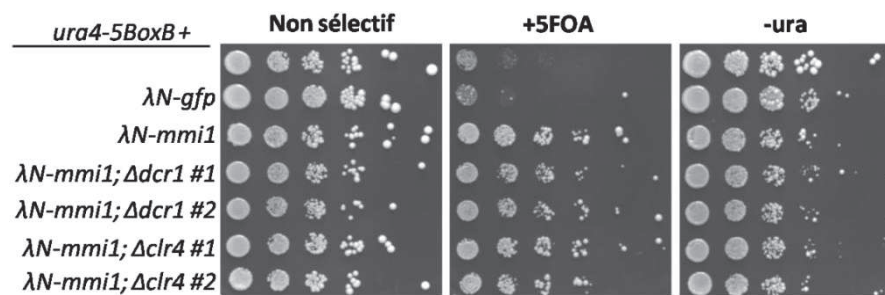


Figure 39. Le « silencing » du gène *ura4-5BoxB* ne dépend pas du RNAi ou de l'hétérochromatine. Test de « silencing » sur les souches *ura4-5BoxB* (SPV912); *ura4-5BoxB*; *λN-gfp* (SPV914), *ura4-5BoxB*; *λN-mmi1* (SPV1038), *u5B*; *λN-mmi1*; $\Delta dcr1$ #1 et 2 (SPV1114 et 1115) et *u5B*; *λN-mmi1*; $\Delta clr4$ #1 et 2 (SPV1117 et 1194). Les cellules sont déposées sur un milieu Emmc (non sélectif), Emmc-ura ou +5FOA.

Les tests de « silencing » ne nous ont pas permis de mettre en évidence une implication du RNAi ou des acteurs de l'hétérochromatine dans ce système rapporteur, dans des cellules en cycle végétatif. Deux hypothèses sont possibles : soit λN -Mmi1 n'est pas suffisant pour recruter ses mécanismes répresseurs sur l'ARN ou le gène rapporteur, soit la construction λN -Mmi1 perturbe la connexion fonctionnelle entre ces mécanismes et ceux de Mmi1 (connexion mise en évidence par l'ensemble de nos résultats). Afin de tester ces hypothèses, j'ai analysé le recrutement de Chp1 sur l'ARN du gène rapporteur *ura4-5BoxB* par RIP. Pour cela, j'ai généré des souches exprimant Chp1 étiquetée avec 13 peptides Myc à partir des souches *ura4-5BoxB λN-mmi1*. Les résultats présentés sur la Figure 40 A révèlent que dans nos conditions expérimentales, Chp1 n'est effectivement pas associée à l'ARN *ura4-5BoxB*. Mmi1 ne serait donc pas capable d'induire le recrutement de RITS à un ARN cible.

Nous avons constaté que les enrichissements obtenus pour l'association de Chp1-13myc avec l'ARN *mei4*, et non avec l'ARN *dg otr1* de l'hétérochromatine, étaient toujours moins élevés dans les souches exprimant λ N-Mmi1 que dans une souche sauvage. J'ai effectué une RIP dans laquelle nous avons testé en parallèle dans les mêmes conditions une souche *chp1-13myc* sauvage pour Mmi1, et une souche *ura4-5BoxB λ N-mmi1 *chp1-13myc**. Les enrichissements obtenus pour Chp1-13myc sur l'ARN *mei4*, étaient de 4,2 pour la souche exprimant λ N-Mmi1, au lieu de 22,4 pour la sauvage pour Mmi1. Ainsi dans cette expérience, l'ajout de l'étiquette λ N en N-ter de Mmi1 a provoqué une perte d'un facteur 5 de Chp1 à l'ARN de *mei4*.

Ce dernier résultat, bien que préliminaire, suggère une perte importante de la fonction de Mmi1 empêchant le recrutement de RITS à un ARN. Cette hypothèse a été renforcée par des CHIP détectant la marque H3k9me2 à la chromatine des différents gènes cibles de Mmi1 réalisées dans les souches *ura4-5BoxB λ N-mmi1 *chp1-13myc**. En effet, la présence de cette marque au niveau de la chromatine des gènes *mei4*, *ssm4*, *mug8* et *mug9*, est réduite d'environ 90% dans les souches *ura4-5BoxB λ N-Mmi1* (Figure 40 B). Ce résultat suggère fortement que le simple fait d'ajouter une extension N-Ter à la protéine Mmi1 empêche l'établissement de la méthylation H3K9 sur ses gènes cibles, possiblement par l'incapacité de Mmi1 à se lier à Chp1, et donc à recruter RITS. Le changement du niveau d'expression de Mmi1 dans ces souches (placé sous le contrôle du promoteur *p3nmt1*) pourrait également en être la cause. Quelle qu'en soit la raison, cette interférence rend très délicate toute interprétation sur les connexions fonctionnelles entre Mmi1 et les protéines de l'hétérochromatine et du RNAi, et une stratégie alternative a été mise en œuvre.

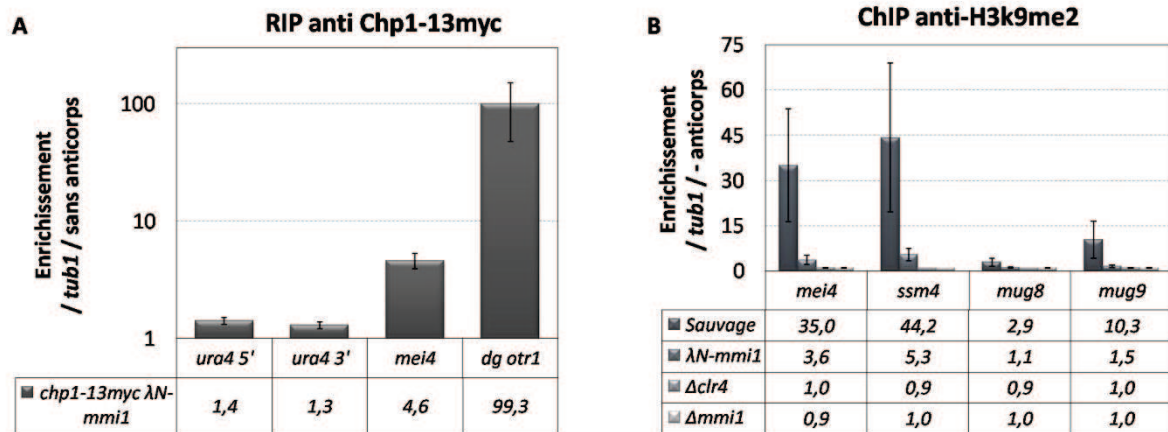


Figure 40. La protéine λ N-Mmi1 ne suffirait pas pour recruter à elle seule Chp1 sur un ARN. **A/** Analyse par RIP α -myc du recrutement de Chp1-13myc dans la souche SPV1829 (*chp1-13myc*; *ura4-5BoxB*; *λN-mmi1*) sur l'ARN d'*ura4-5BoxB*, soit en 5' de la CDS (PV209/210), soit en 3' (PV1218/1219); *mei4* (PV180/181); et *dg otr1* (PV256/257). Les enrichissements sont calculés relativement à l'ARN contrôle *tub1* (PV176/177), et aux signaux obtenus dans l'échantillon ayant subi l'IP sans anticorps (voir la partie « Matériels et Méthodes »). Le graphe représente la moyenne des enrichissements obtenus pour 4 RIP indépendantes, ainsi que les écarts moyens (SD) correspondants. L'échelle de l'axe des ordonnées du graphique est en log base 10. **B/** La protéine chimère λ N-Mmi1 n'est que partiellement fonctionnelle. Analyse de la présence de la marque H₃k₉me₂ au niveau de la chromatine des gènes *mei4* (PV180/181), *ssm4* (PV182/183); *mug8* (PV1097/1098), et *mug9* (PV1103/1104) par ChIP α -H₃k₉me₂ suivie d'une qPCR, dans les souches sauvage (SPV8), *ura4-5BoxB*; *λN-mmi1* (SPV1038), *Δclr4* (SPV17733), et la souche *Δmmi1* (SPV1819). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV176/177), et à l'échantillon sans anticorps. Les valeurs correspondent à la moyenne des enrichissements obtenus pour 2 ChIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) associés.

2.1.3. Mise en place d'un nouveau système rapporteur Mmi1- λ N / *ura4-5BoxB*

Puisqu'une étiquette fusionnée du côté N-Ter de Mmi1 perturbe le recrutement de RITS aux ARN cibles de Mmi1, j'ai construit une souche dans laquelle Mmi1 est étiquetée par λ N du côté C-ter. Malheureusement, aucun clone viable n'a pu être obtenu, suggérant que cette construction induit une perte encore plus importante de la fonction de Mmi1, qui conduirait à la létalité des cellules comme décrit précédemment (paragraphe 3.2.3.1. de l'introduction).

Pour palier à ce nouveau problème, cette dernière construction a été insérée à la place du gène *leu1*, dans une souche exprimant la version sauvage du gène *mmi1*, ainsi que le

gène *ura4-5BoxB*. Ces souches expriment ainsi deux versions de la protéine Mmi1, en compétition l'une avec l'autre, afin d'éviter la létalité observée précédemment.

Les tests de « silencing » du gène *ura4-5BoxB* dans ces souches ont été réalisés en parallèle sur un milieu riche (YEA) et un milieu minimum (Emmc). Les résultats obtenus sur le milieu riche montrent que les souches des deux génotypes *ura4-5BoxB* et *ura4-5BoxB mmi1-λN* ont le même défaut de croissance en présence de 5FOA, suggérant que la protéine Mmi1-λN n'est pas capable d'induire le « silencing » du gène rapporteur (YEA et YEA+5FOA, Figure 37). De plus, les cellules exprimant la protéine chimère Mmi1-λN ne parviennent pas à se développer sur le milieu minimum pourtant non sélectif (Emmc), et ce malgré la présence de Mmi1 endogène (Emmc, Figure 41). Sur un tel milieu, les nutriments sont présents en quantité plus limitée que dans le milieu riche. Ces conditions pourraient favoriser le déclenchement de la différenciation sexuelle dans des cellules présentant des déficiences pour un des différents mécanismes inhibiteurs de ce processus dont Mmi1 fait partie (voir le chapitre III de l'introduction). Sur ce milieu minimum, la compétition entre la forme non fonctionnelle Mmi1-λN, et la version sauvage Mmi1 pourrait l'empêcher d'assurer sa fonction dans l'inhibition de gènes méiotiques, dont *mei4*, inhibition vitale pour les cellules haploïdes en cycle végétatif. L'ensemble de ces résultats suggère cette fois encore une perte de fonction de la protéine Mmi1 liée à l'étiquette en C-ter (Figure 41) qui rend notre approche expérimentale inutilisable dans ce contexte.

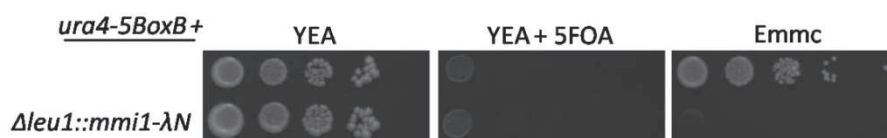


Figure 41. La protéine chimère Mmi1-λN n'est pas fonctionnelle et se conduit comme un dominant négatif. Test de « silencing » sur les souches *ura4-5BoxB* (SPV912) et *ura4-5BoxB; mmi1-λN* (SPV2095). Les cellules sont déposées sur un milieu minimum Emmc (non sélectif), Emmc-ura ou +5FOA, ou un milieu riche YEA (non sélectif), ou YEA+5FOA

2.2. La séquence DSR du gène *mei4* est suffisante pour recruter RITS à un ARN produit par le locus de ce gène

2.2.1. Mise en place et étude du système rapporteur « *ura4-dsr_{mei4}* »

L'étiquetage de la protéine Mmi1 s'étant avéré inadapté pour répondre à la question de la suffisance de cette protéine pour le recrutement de la machinerie du RNAi, nous avons mis en place une stratégie alternative.

J'ai construit un système rapporteur utilisant la séquence DSR du gène *mei4*. Cette séquence, qui est nécessaire et suffisante pour la fixation de Mmi1 sur l'ARN (Harigaya et al., 2006), a été insérée en amont de la région 3'UTR du gène *ura4* pour former le gène chimère *ura4-dsr_{mei4}*. Cette construction devrait induire l'ancrage de Mmi1 sur l'ARN correspondant, et ainsi permettre l'étude du recrutement de RITS, et du « silencing » éventuel de ce gène. Une construction contrôle a été réalisée de la même manière pour former le gène *ura4-gfp* qui permettra de vérifier la fonctionnalité de la protéine Ura4 correspondante.

Différentes souches ont été générées par intégration de ces constructions à la place de la séquence codante du gène *mei4*, plaçant ainsi les gènes rapporteurs *ura4-dsr_{mei4}* ou *ura4-gfp* sous le contrôle du promoteur endogène de *mei4* (Figure 42 A). Le choix du locus *mei4* pour l'insertion de ces transgènes a été dicté par les résultats présentés dans le chapitre I, montrant la présence de la marque H3K9me et de RITS à la chromatine de ce gène.

J'ai vérifié dans un premier temps le bon fonctionnement de ce système en réalisant des tests de « silencing » du gène *ura4* à partir de ces différentes souches. Ces tests montrent que ces souches se développent de manière correcte et équivalente sur le milieu non sélectif. La souche contrôle déficiente pour le gène *ura4* se comporte comme attendu : elle se développe très bien sur le milieu sélectif contenant du 5FOA, et elle est par contre incapable de croître en l'absence d'uracile (Figure 42 B). A l'opposé, les trois isolats exprimant le gène *ura4-gfp* ne sont pas capables de se développer correctement en présence de 5FOA et poussent très bien sur un milieu dépourvu en uracile, confirmant ainsi la fonctionnalité d'Ura4 dans ces cellules (Figure 42 B). Enfin, les cellules exprimant le gène *ura4-dsr_{mei4}* quant à elles se développent très bien en présence de 5FOA, indiquant que la séquence *dsr_{mei4}* suffirait à induire le « silencing » du transgène. Les 2 isolats étudiés

parviennent tout de même à se développer sur le milieu dépourvu en uracile, mais forment des colonies plus petites que les souches *ura4-gfp*. Ces premiers résultats suggèrent que le « silencing » établi au niveau du gène *ura4-dsr_{mei4}* est permissif à des fuites. Ceci pourrait refléter le fait que le « silencing » dépendant de la séquence *dsr_{mei4}* ne serait pas suffisant pour aboutir à un phénotype semblable à celui d'une souche Δ *ura4*. Le même phénomène est observé lors d'une insertion du gène *ura4* au niveau des péricentromères (données non montrées).

Afin de confirmer que ce « silencing » dépend de la protéine Mmi1, les gènes rapporteurs *ura4-dsr_{mei4}* et *ura4-gfp* ont été introduits dans une souche Δ *mmi1*. Dans un nouveau test de « silencing » les cellules déficientes en Mmi1 ne sont pas capables de se développer en présence de 5FOA, indiquant que la mutation Δ *mmi1* est responsable d'une levée du « silencing » du transgène (Figure 42 B, panneau du bas). Ce résultat montre que le « silencing » du gène *ura4-dsr_{mei4}* requiert la protéine Mmi1.

Le mécanisme de régulation par Mmi1 étant connu pour agir directement sur les ARN cibles et induire leur dégradation, j'ai vérifié la possibilité de la mise en place d'un tel mécanisme au niveau de nos systèmes rapporteurs. Pour cela, j'ai quantifié le niveau des transcrits issus des gènes *ura4-dsr_{mei4}* ou *ura4-gfp* dans ces deux souches. Les RT-qPCR réalisées à partir des ARN totaux montrent que le niveau des ARN globaux (ARN sens et antisens) *ura4-dsr_{mei4}* est 60 à 70% plus faible que celui des ARN *ura4-gfp* (Figure 42 C). Ce résultat confirme la mise en place d'un processus de répression au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel de l'ARN fusionné à *dsr_{mei4}*.

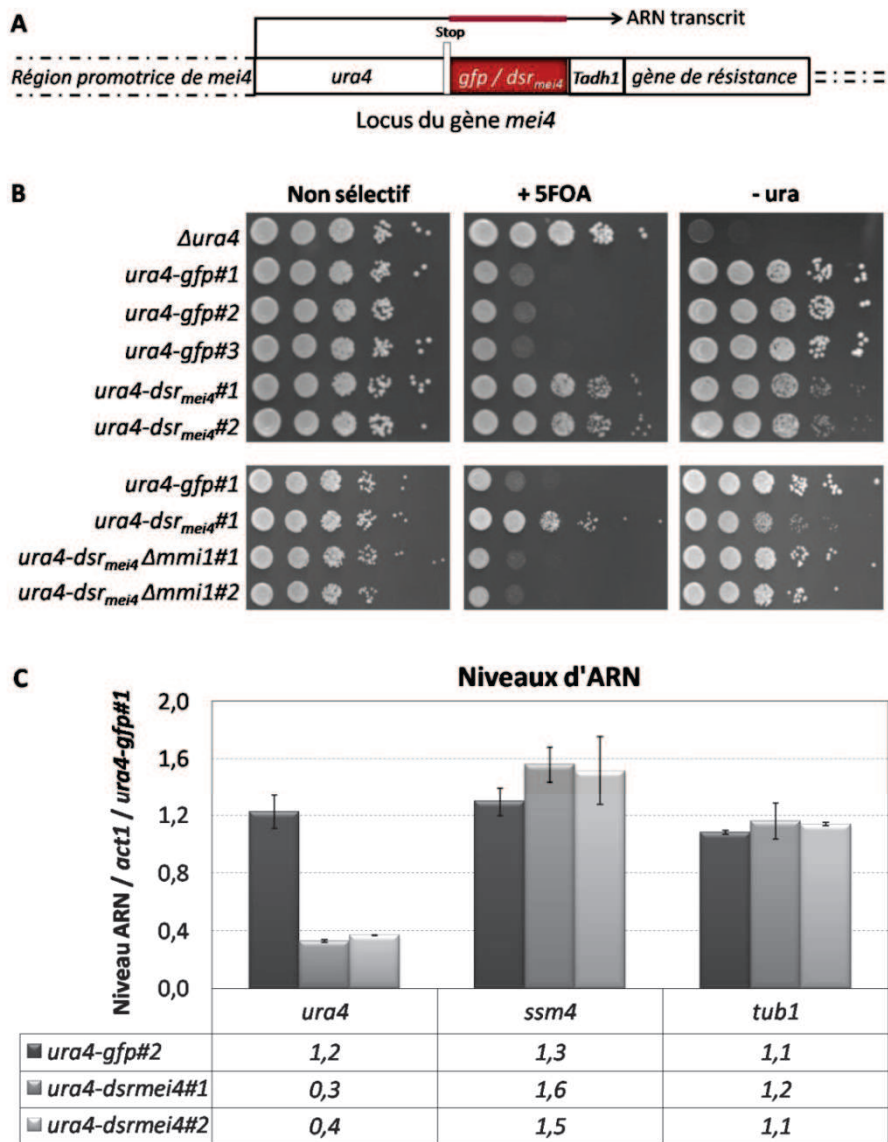


Figure 42. La séquence DSR de *mei4* suffit pour induire le « silencing » Mmi1-dépendant d'un gène rapporteur inséré dans le locus *mei4*. **A/** Représentation schématique des gènes chimères introduits dans le locus endogène du gène *mei4* : la séquence *dsr_{mei4}* ou le gène *gfp* (boîte rouge), ainsi que le terminateur du gène *adh1* (boîte blanche *Tadh1*), sont positionnés dans le 3' UTR du gène *ura4* (boîte blanche *ura4*), placé sous le contrôle du promoteur de *mei4* endogène. L'ARN résultant de la transcription de ce gène chimère est modélisé par une flèche. **B/** La séquence *dsr_{mei4}*, fusionnée au gène *ura4*, suffit pour induire le « silencing » Mmi1-dépendant de ce gène chimérique. Test de « silencing » sur les souches $\Delta ura4$ (SPV388); *ura4-gfp* isolats #1, 2 et 3 (SPV916, 917 et 918); *ura4-dsr_{mei4}* isolats #1 et 2 (SPV 919 et 920), *ura4-dsr_{mei4} Δmmi1* isolats #1 et 2 (980 et 981). Les cellules sont déposées sur le milieu PMGc (non sélectif), PMGc-ura ou +5FOA. **C/** La séquence *dsr_{mei4}* suffit pour induire une diminution du niveau de l'ARN correspondant. Analyse par RT-qPCR : les niveaux d'ARN totaux du gène chimère *ura4* (PV209/210), ainsi que de gènes contrôles, le gène DSR *ssm4* (PV182/183), et le gène neutre, *tub1* (PV176/177) sont quantifiés relativement au gène contrôle *act1* (PV174/175) et à la souche *ura4-gfp* isolat #1 (SPV916). Les niveaux de l'ARN *ura4-dsr_{mei4}* dans les souches *ura4-dsr_{mei4}#1* et 2 (SPV 919 et 920) sont en moyenne 70% plus faibles que le niveau de l'ARN *ura4-gfp* dans les souches *ura4-gfp* isolats #1 et 2 (SPV916 et 917).

Dans un deuxième temps, j'ai voulu vérifier la suffisance de la séquence DSR pour induire le recrutement du complexe RITS.

J'ai d'abord analysé l'association de Chp1 à la chromatine des deux gènes chimères *ura4* par CHIP. Pour cela, l'étiquette *tap* a été fusionnée au gène *chp1* dans les souches exprimant les deux transgènes. Les résultats montrent que Chp1-TAP est recruté à la chromatine des loci *dg otr1* et *ssm4* utilisés comme contrôles, mais n'ont pas permis la détection de Chp1-TAP sur le gène *ura4-dsr_{mei4}* (Figure 43 A et B). Ceci suggère que la séquence *dsr_{mei4}* ne suffirait pas pour induire le recrutement de Chp1 au niveau de la chromatine du gène rapporteur *ura4-dsr_{mei4}*.

J'ai alors examiné la présence de Chp1 sur l'ARN *ura4-dsr_{mei4}*. Les RIP effectuées dans ces mêmes souches confirment que la protéine Chp1-TAP est bien localisée sur les ARN des deux loci contrôles *dg otr1* et *ssm4*. Les résultats indiquent que Chp1-TAP est également associée à l'ARN d'*ura4-dsr_{mei4}*, mais pas à l'ARN *ura4-gfp* (Figure 43 C). La séquence DSR de *mei4*, suffirait donc à elle-seule pour recruter Chp1 sur un ARN rapporteur produit à partir du locus *mei4*, mais pas sur la chromatine.

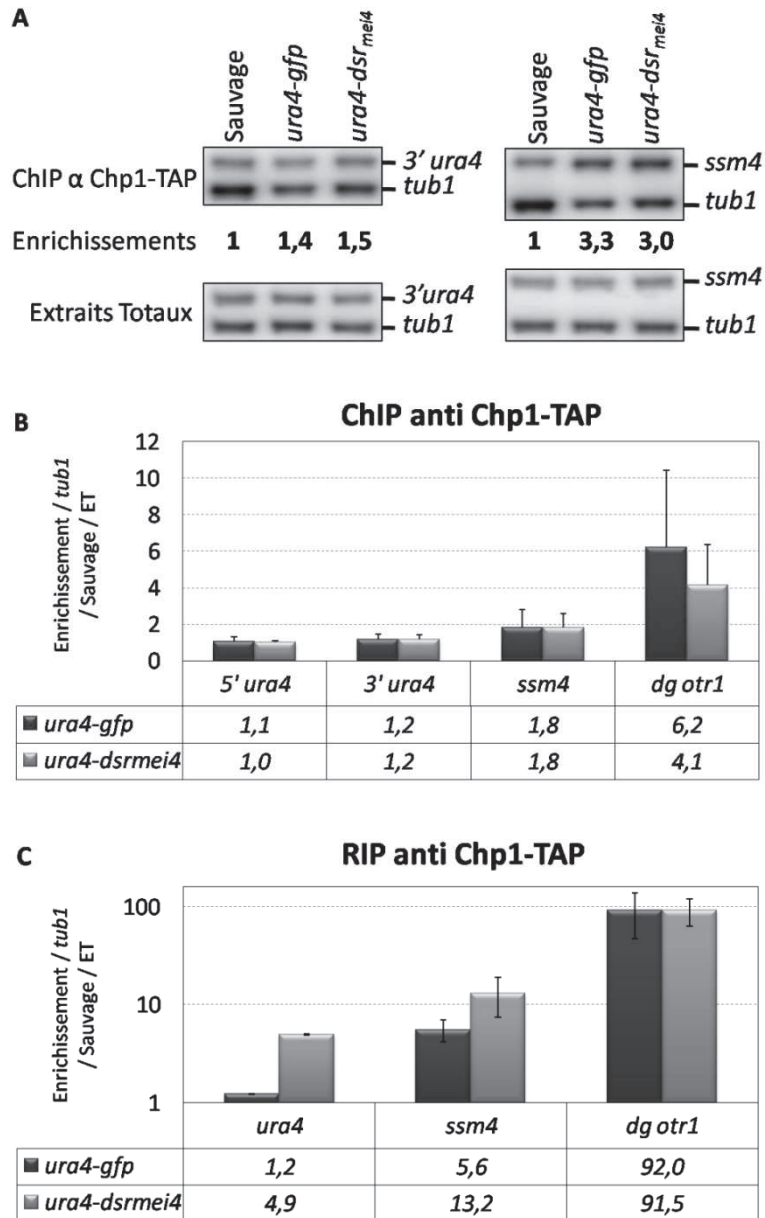


Figure 43. La séquence DSR de *mei4* suffit pour induire le recrutement de Chp1 à un ARN rapporteur, mais pas à la chromatine. A/ La séquence *dsr_{mei4}* ne suffit pas pour induire le recrutement de Chp1 à la chromatine d'un gène rapporteur. Analyse par ChIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine d'*ura4* en 3' de la CDS (PV209/AV151) et de *ssm4* (PV60/61), dans la souche *ura4-gfp* (SPV916), et la souche *ura4-dsr_{mei4}* (SPV919). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV74/75), et à la souche sauvage (SPV8). **B/** Analyse par ChIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur la chromatine des gènes *ura4* en 3' (PV209/AV151) et en 5' de la CDS (PV293/201), *ssm4* (PV60/61), et *dg otr1* (PV150/151). Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1* (PV74/75), et à la souche sauvage (SPV8). Les valeurs représentent la moyenne des enrichissements obtenus pour 3 ChIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) correspondants. **C/** La séquence *dsr_{mei4}* suffit pour induire le recrutement de Chp1 à un ARN rapporteur. Analyse par RIP α -TAP du recrutement de Chp1-TAP sur l'ARN d'*ura4* (PV209/210); *ssm4* (PV182/183); *mug8* (PV818/819), et *dg otr1* (PV256/257), dans la souche *ura4-gfp* (SPV916), et la souche *ura4-dsr_{mei4}* (SPV919). Les enrichissements sont calculés relativement à l'ARN contrôle *tub1*

(PV176/177), et à la souche sauvage (SPV8). Les valeurs correspondent à la moyenne des enrichissements obtenus pour 2 RIP indépendantes, avec les écarts moyens (SD) associés. L'échelle de l'axe des ordonnées du graphique est en log base 10.

Dans un dernier temps, j'ai testé l'implication des acteurs de l'hétérochromatine et du RNAi dans le « silencing » établi par Mmi1 au niveau du gène *ura4-dsr_{mei4}*. Pour cela, j'ai effectué des tests de « silencing », dans des souches déficientes pour Mmi1, Clr4, Dcr1, ou Ago1 et exprimant toutes le gène rapporteur *ura4-dsr_{mei4}*. Les résultats confirment tout d'abord l'implication de Mmi1 dans le « silencing » du gène *ura4-dsr_{mei4}*, puisque la souche $\Delta mmi1$ pousse très mal en présence de 5FOA, et parfaitement bien sur un milieu dépourvu d'uracile (Figure 44). Par contre, les trois autres mutants ($\Delta clr4$, $\Delta dcr1$ et $\Delta ago1$) montrent un comportement opposé : ils sont tous capables de pousser en présence de 5FOA, indiquant que le « silencing » du gène *ura4-dsr_{mei4}* n'est pas levé dans ces souches. Ces données sont confirmées par la très faible capacité de pousse de ces trois mêmes souches en absence d'uracile (Figure 44). Ainsi les mécanismes liés à la formation d'hétérochromatine et au RNAi ne seraient pas impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène chimère, possiblement parce que ce système rapporteur ne recrute pas efficacement RITS à l'ARN et pas du tout à la chromatine.

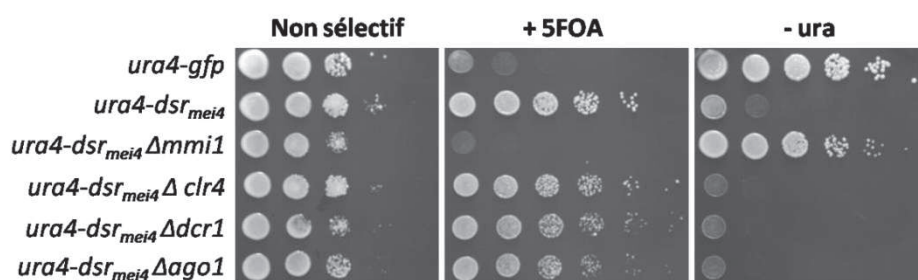


Figure 44. Le « silencing » du gène *ura4-dsr_{mei4}* ne dépend pas du RNAi. Test de « silencing » sur les souches *ura4-gfp* (SPV916); *ura4-dsr_{mei4}* (SPV 919), *ura4-dsr_{mei4} Δmmi1* (SPV980), *ura4-dsr_{mei4} Δ clr4* (SPV986), *ura4-dsr_{mei4} Δdcr1* (SPV1022) et *ura4-dsr_{mei4} Δago1* (SPV 1007). Les cellules sont déposées sur le milieu Emmc (non sélectif), Emmc +5FOA ou Emmc-ura.

En conclusion, l'ensemble des résultats de ce paragraphe indique que la séquence DSR du gène *mei4* est suffisante pour permettre le recrutement de Chp1 sur un ARN dont

l'expression est sous le contrôle du promoteur du gène *mei4*, potentiellement par l'intermédiaire de Mmi1. Elle ne serait en revanche pas suffisante pour une association de Chp1 à la chromatine, suggérant que des éléments supplémentaires restent à être identifiés. Par ailleurs, cette séquence DSR suffit pour induire le « silencing » d'un transgène de manière dépendante de Mmi1, mais indépendante du RNAi et de Clr4. Cependant, on ne peut exclure la possibilité que nos tests ne présentent pas une sensibilité suffisante pour détecter une implication modérée de ces processus dans le « silencing » de ce transgène, au cours du cycle végétatif. Il faudrait compléter ces tests par des expériences de RT-qPCR sur les ARN extraits de ces différentes souches.

2.2.2. Etude du système rapporteur « *ura4*-dsr_{mei4}* »

Dans les constructions *ura4-dsr_{mei4}* et *ura4-gfp*, la distance entre le codon stop du gène *ura4*, et le terminateur de la transcription *Tadh1* est augmentée de manière conséquente par l'ajout des séquences *dsr_{mei4}* ou *gfp* (respectivement 342 ou 714 nts ; Figure 42 A). Le codon stop des transgènes pourrait être reconnu comme un codon stop aberrant par la voie de dégradation des ARNm non sens ou « nonsens mediated mRNA decay » (NMD, pour revue Shyu et al., 2008). En effet, il a été montré chez les eucaryotes que la distance en nucléotides entre le codon stop et le 3'UTR d'un ARNm joue un rôle important dans la terminaison de la traduction et la stabilité de cet ARN. L'introduction de codons stop prématurés dans une ORF, en amont du codon stop naturel, induirait la reconnaissance de cet ARN aberrant par les facteurs Upf de la voie NMD, conservés chez *S. pombe* (Mendell et al., 2000 ; Rodriguez-Gabriel et al., 2006), afin de prévenir la production de protéines tronquées (Amrani et al., 2004 ; Behm-Ansmant et al., 2007).

Bien que les résultats du test de « silencing » (Figure 42 B et 44) dénotent la production d'une protéine Ura4 fonctionnelle, le niveau d'ARNm correspondant pourrait être significativement diminué par la voie NMD jusqu'à expliquer une absence d'effet de la délétion des acteurs de l'hétérochromatine ou du RNAi. Dans le but d'exclure toute possibilité de dégradation artefactuelle des ARN par la voie NMD, j'ai éliminé le codon stop proximal des constructions *ura4-dsr_{mei4}* et *ura4-gfp* précédentes, ne laissant que le codon

stop (déjà présent) des séquences *dsr_{mei4}* ou *gfp*. Ces nouvelles constructions notées *ura4*-dsr_{mei4}*, et *ura4*-gfp* ont été intégrées dans le locus du gène *mei4*, de la même façon que précédemment.

Les tests de « silencing » effectués dans ces nouvelles souches présentent des résultats similaires aux précédents : la fusion de la séquence *dsr_{mei4}*, au gène *ura4*, induit bien un « silencing » du transgène *ura4*-dsr_{mei4}* dépendant de Mmi1. Par contre ce « silencing » ne dépendrait pas d'Ago1 (Figure 45).

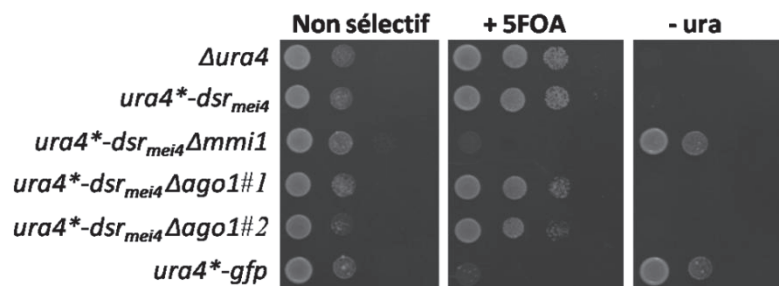


Figure 45. La séquence DSR de *mei4* fusionnée à un gène rapporteur suffit pour induire son « silencing » de manière dépendante de Mmi1, et indépendante de Ago1. Test de « silencing » sur les souches *Δura4* (SPV388), *ura4*-dsr_{mei4}* (SPV2012), *ura4*-dsr_{mei4} Δmimi1* (SPV2077), *ura4*-dsr_{mei4} Δago1#1* et #2 (SPV2068 et 2069), et *ura4*-gfp* (SPV2011). Les cellules sont déposées sur le milieu Emmc (non sélectif), Emmc+5FOA ou Emmc-ura.

2.3. La séquence DSR du gène *mei4* suffit pour induire le recrutement de Chp1 à un ARN produit par le locus *ura4*

Les données précédentes indiquent l'importance de deux éléments du locus de *mei4* pour le recrutement de Chp1 sur l'ARN : premièrement, la séquence DSR (Figure 2 A et B et S2A de l'article de recherche) et deuxièmement la région promotrice (Figure 33, 35 et 36). Par ailleurs, la séquence DSR du gène *mei4* est capable d'induire le recrutement de Chp1 sur un ARN rapporteur contenant cette séquence, et transcrit à partir du promoteur de *mei4* (paragraphe précédent, système *ura4-dsr_{mei4}*).

Dans le but de préciser l'importance du locus du gène *mei4*, j'ai créé un nouveau système rapporteur dans lequel la séquence DSR du gène *mei4* a été fusionnée au gène

rapporteur *gfp*. Ce gène chimère *gfp-dsr_{mei4}* a ensuite été introduit dans le locus du gène *ura4*, de manière à le placer sous le contrôle du promoteur endogène de ce gène, moins fort que le promoteur p3nmt1 utilisé précédemment (Figure 46 B). Une souche contrôle exprimant le gène *gfp* sans séquence *dsr_{mei4}* a également été générée (Figure 46 A).

Dans un premier temps, j'ai comparé les niveaux d'ARN *gfp-dsr_{mei4}* à ceux produits dans les souches *gfp*, par RT-qPCR à partir d'ARN totaux. Les quantifications révèlent une diminution de 60% des ARN *gfp-dsr_{mei4}* par rapport aux ARN contrôles *gfp* (Figure 46 C). Cette diminution est spécifique des ARN *gfp-dsr_{mei4}* puisque les niveaux d'ARN de différents gènes ciblés par Mmi1 et RITS, les gènes *mei4*, *ssm4*, *mug8*, et *mug9*, ainsi que ceux de la séquence *dg otr1* ou du gène de ménage *tub1* sont équivalents dans les souches *gfp-dsr_{mei4}* et *gfp* (Figure 46 C). Ce résultat indique que la séquence *dsr_{mei4}* induit une diminution spécifique du niveau d'ARN du transgène, probablement liée à la mise en place d'une régulation supplémentaire du gène *gfp-dsr_{mei4}* au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

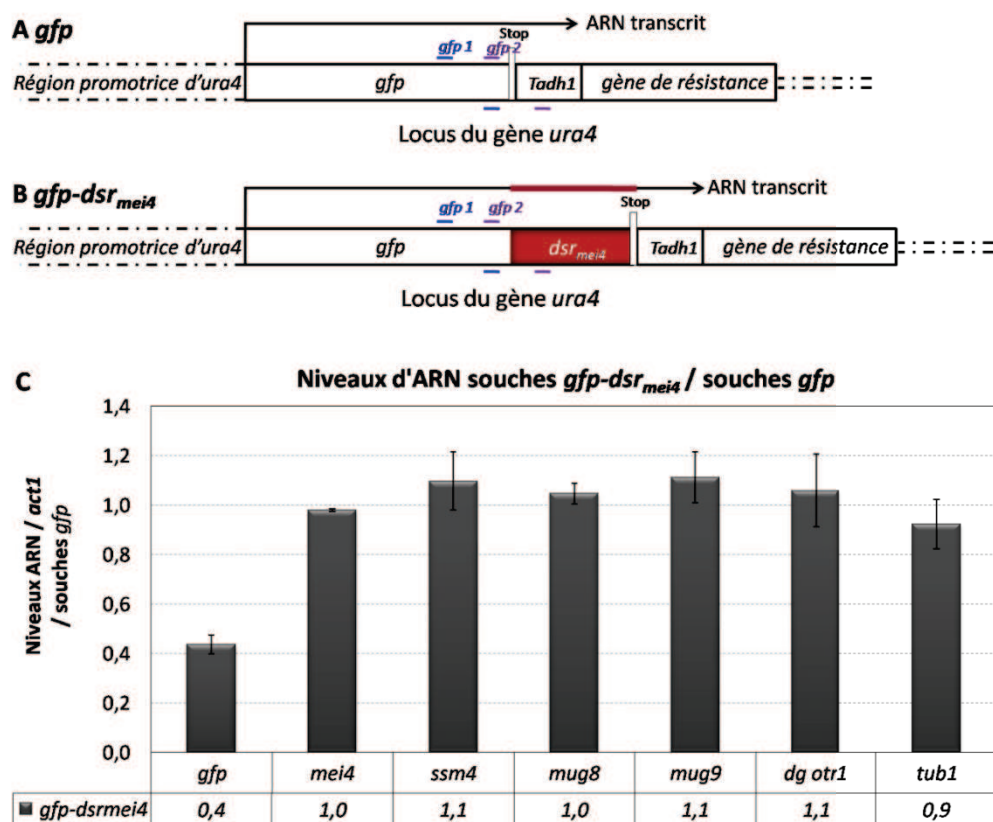


Figure 46. La séquence DSR de *mei4* fusionnée à un ARN produit par le locus *ura4* suffirait pour induire le « silencing ». A et B/ Représentation schématique des gènes chimériques introduits dans

le locus endogène du gène *ura4* : le gène *gfp* (A/, boîte blanche *gfp*), ou le gène *gfp* fusionné à la séquence *dsr_{mei4}* (B/ boîte rouge), associés au terminateur du gène *adh1* (boîte blanche *Tadh1*), et à un gène de résistance à un antibiotique sont introduits par recombinaison homologue à la place de la CDS du gène *ura4*. Ces constructions sont ainsi placées sous le contrôle du promoteur du gène *ura4* endogène. L'ARN résultant de la transcription de ce gène chimérique est modélisé par une flèche. Les traits bleus représentent le couple d'amorces *gfp1* PV1242/1243, et les traits violets représentent soit le couple d'amorces *gfp 2* : soit *gfp-Tadh1* (PV1216/1264) pour la souche *gfp*, soit *gfp-dsr* (PV1216/1217) pour la souche *gfp-dsr_{mei4}*. C/ La séquence *dsr_{mei4}* suffit pour induire une diminution de 60% du niveau de l'ARN total correspondant. Analyse par RT-qPCR : Les niveaux des ARN du gène chimère *gfp* (PV1242/1243), ainsi que de gènes contrôles : les gènes DSR *mei4* (PV1150/1151), *ssm4* (PV1111/1112), *mug8* (PV1097/1098), *mug9* (PV1103/1104), le gène *tub1* (PV176/177), et une région de l'hétérochromatine, *dg otr1* (PV256/257) sont quantifiés relativement au gène contrôle *act1* (PV174/175). Les résultats ont été obtenus suite à une expérience de RT-qPCR réalisée sur deux isolats de chaque souche. Les moyennes des niveaux d'ARN des souches *gfp-dsr_{mei4}* (SPV1832 et 1833) et aux moyennes des niveaux d'ARN obtenus pour deux isolats des souches *gfp* (SPV1965 et 1966) sont représentées, avec les écarts moyens correspondants. Les niveaux de l'ARN *gfp-dsr_{mei4}* dans les souches *gfp-dsr_{mei4}* (SPV1832 et 1833) sont en moyenne 60% plus faibles que le niveau de l'ARN *gfp* dans les souches *gfp* (SPV1965 et 1966).

Afin de vérifier si cette inhibition peut être corrélée au recrutement de Mmi1 et de Chp1 sur l'ARN *gfp*, via la séquence *dsr_{mei4}*, j'ai créé des souches exprimant la protéine chimère Chp1-13myc à partir des souches *gfp-dsr_{mei4}* et *gfp*.

J'ai d'abord réalisé des expériences de RIP contre la protéine Mmi1 sur ces souches. Les résultats montrent que Mmi1 s'associe spécifiquement avec l'ARN *gfp-dsr_{mei4}*, mais pas avec l'ARN *gfp* (Figure 47 A), confirmant le recrutement de Mmi1 par la séquence *dsr_{mei4}* et suggérant ainsi l'implication de cette protéine dans la régulation de l'expression du transgène (Figure 46 C).

J'ai ensuite effectué des RIP dirigées contre la protéine Chp1-13myc. Celles-ci révèlent que Chp1 est elle aussi spécifiquement recrutée, faiblement mais de manière reproductible sur l'ARN *gfp-dsr_{mei4}* (Figure 47 B).

En conclusion, le niveau de transcription établi par le promoteur *ura4* permet le recrutement de Chp1 sur l'ARN correspondant, à la condition que ce dernier possède une région DSR. La présence de la région promotrice de *mei4* n'est donc pas strictement requise pour le ciblage de Chp1 sur l'ARN. Il semblerait donc que le niveau de transcription lié au promoteur, plutôt que la séquence de celui-ci, soit l'élément déterminant dans le

recrutement de Chp1. Ainsi, la séquence dsr_{mei4} semble être l'élément essentiel et suffisant pour induire l'association de Chp1 à un ARN.

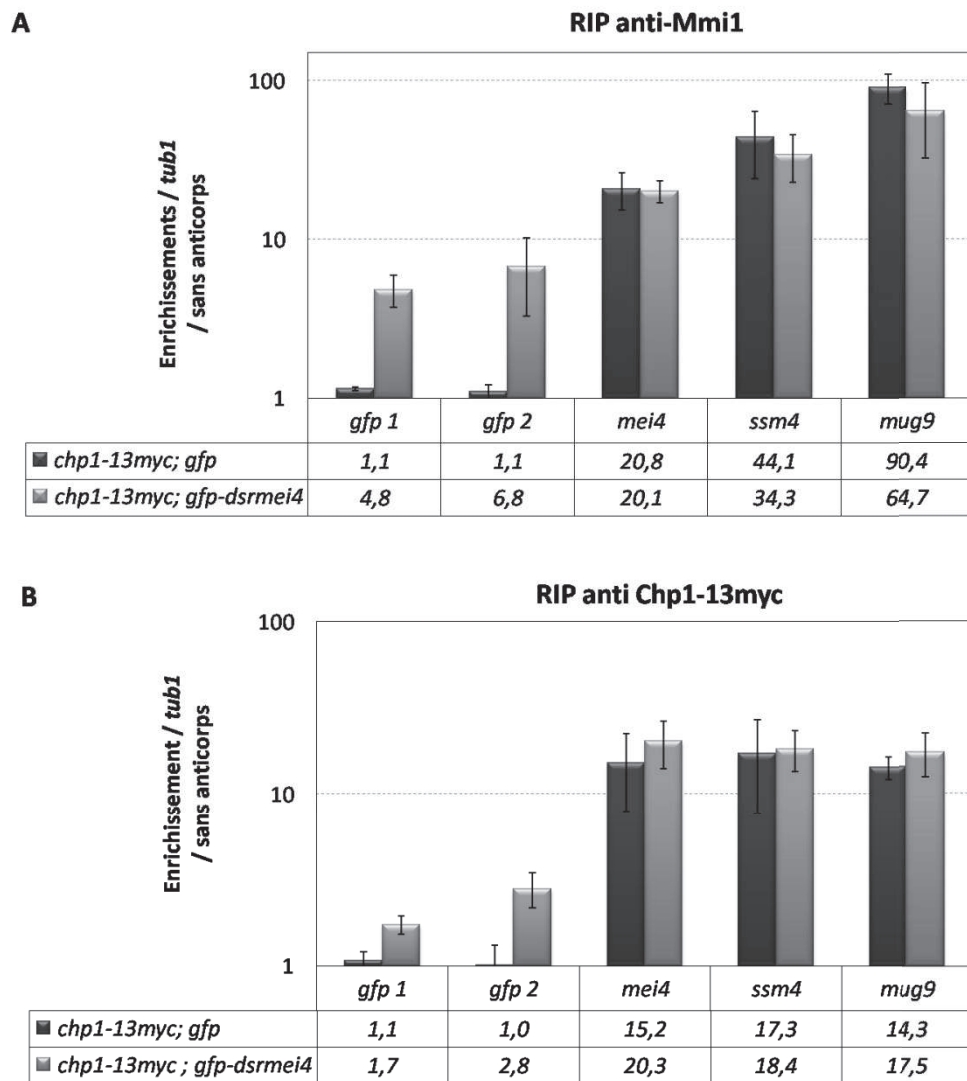


Figure 47. La séquence DSR de $mei4$ fusionnée à un ARN suffit pour recruter Chp1. A/ La séquence dsr_{mei4} suffit pour induire le recrutement de Mmi1 à un ARN rapporteur. Analyse par RIP α -Mmi1 (A) ou α -myc (B) du recrutement de Mmi1 et de Chp1 sur l'ARN *gfp* (*gfp 1* : PV1242/1243, traits bleus sur le schéma de la Figure 41 A ; *gfp2* = *gfp-Tadh1* pour la souche *gfp*: PV1216/1264 et *gfp-dsr_{mei4}* pour la souche *gfp-dsr_{mei4}* : PV1216/1217, traits violets sur la Figure 43 A et B); *mei4* (PV1150/1151) ; *ssm4* (PV182/183); et *mug9* (PV1103/1104) dans la souche *gfp* (SPV1965), et la souche *gfp-dsr_{mei4}* (SPV1832). Les enrichissements sont calculés relativement à l'ARN contrôle *tub1* (PV176/177), et aux échantillons sans anticorps. Les valeurs correspondent à la moyenne des enrichissements obtenus pour 3 RIP indépendantes pour A, et 4 RIP indépendantes pour B, avec les écarts moyens (SD) correspondants. L'échelle de l'axe des ordonnées du graphique est en log base 10 pour le panneau A.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que le complexe RITS et Mmi1 pourraient cibler spécifiquement tous les ARN des gènes contenant une région DSR, définie comme telle par la présence répétée des motifs hexamériques reconnus par Mmi1 (voir les figures 3 et S4 de l'article de recherche), par l'intermédiaire de Mmi1. Cette hypothèse est discutée plus amplement dans la partie Discussion.

-Conclusion-

Nos travaux suggèrent pour la première fois que RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing ; Verdel et al., 2004), le complexe effecteur du RNAi chez *S. pombe*, s'associe de manière spécifique avec l'ARN messager (ARNm) de près d'une vingtaine de gènes codants, et de l'ARNnc meiARN, tous impliqués dans les phases précoces de la différenciation sexuelle. Certains de ces gènes sont également ciblés au niveau de leur chromatine. Nous montrons qu'une protéine liant l'ARN, Mmi1 (Harigaya et al., 2006), est essentielle au recrutement de RITS sur ces ARN, et apporterait la spécificité du ciblage de ces gènes par RITS. Par ailleurs, l'ensemble de nos résultats indique que le RNAi et l'HMT Clr4 pourraient faciliter la répression de ces gènes méiotiques en agissant au niveau post-transcriptionnel comme modulateur de la stabilité et/ou la maturation de leurs ARNm. Ces résultats dévoilent l'existence d'un nouveau mode d'action du RNAi et de Clr4, inédit chez la levure. La répression exercée par le RNAi sur ces gènes méiotiques pourrait impliquer des mécanismes moléculaires similaires à ceux des miARN chez les mammifères (Fabian et al., 2010, et chapitre II de l'introduction de ce manuscrit). Pour une partie de ces gènes, ce mécanisme de répression pourrait être renforcé à la chromatine par l'établissement de la diméthylation de l'histone H3K9, une marque spécifique de l'hétérochromatine. Nos données révèlent que cette régulation de gènes codants par le RNAi et Clr4 ne serait pas restreinte à quelques gènes mais potentiellement orientée vers tous les gènes cibles de Mmi1. L'identification du motif hexamérique reconnu directement par Mmi1 ouvre de nouvelles pistes à explorer dans la recherche de nouveaux gènes ciblés par le RNAi. En effet, nos résultats suggèrent que d'autres gènes contenant une répétition de ces motifs pourraient être des cibles de Mmi1 et du RNAi. Enfin, nos travaux révèlent que le RNAi et Clr4 pourraient faciliter l'inactivation de l'ensemble de ces gènes, permettant ainsi la mise en place de la différenciation sexuelle de manière appropriée.

Ces travaux seront poursuivis avec pour objectif principal d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu par le RNAi lors de la régulation de la différenciation cellulaire (voir la partie Discussion).

-Discussion et perspectives-

Nos travaux montrent que le complexe RITS s'associe à la chromatine ainsi qu'à l'ARN du gène *mei4* lors du cycle végétatif, de manière partiellement dépendante à la RNase III Dcr1, et à l'HMT Clr4, et totalement dépendante de la transcription, de la séquence DSR du gène *mei4*, ainsi que de la protéine Mmi1. Par ailleurs, nous montrons que la séquence DSR du gène *mei4* suffit pour induire le recrutement de la sous-unité de RITS Chp1.

Une étude transcriptomique nous a conduits à l'identification d'un ensemble de gènes dont l'expression est potentiellement régulée par Mmi1, la plupart étant impliqués dans la phase précoce de la différenciation sexuelle. Cette analyse nous a permis d'identifier le motif hexamérique dégénéré reconnu spécifiquement par Mmi1, permettant ainsi de prédire les ARN ciblés directement par Mmi1 et Chp1.

Enfin, nos résultats indiquent que le RNAi et Clr4 pourraient faciliter la répression de ces gènes de la différenciation en modulant la maturation de leurs ARNm, et que cette régulation pourrait bien avoir des conséquences au niveau physiologique lors de la différenciation sexuelle.

1. Ciblage du gène *mei4* par le complexe RITS

Rôle de l'HMT Clr4 et de H3K9me2

La dépendance à la présence de Clr4 que nous mettons en évidence pour l'association de Chp1 à la chromatine du gène *mei4* et pour l'enrichissement de la marque H3K9me2, suggère fortement que se serait l'activité HMT catalysant cette modification qui serait mise en jeu. Le recrutement de Chp1 à l'ARN de *mei4* dépend également en partie de Clr4, suggérant une association de RITS à l'ARN naissant (Figure 1 de l'article). Cependant il reste à explorer la dépendance de Clr4 pour l'association de Chp1 au niveau de ses autres

ARN cibles, pour lesquels l'enrichissement à la chromatine de Chp1 et de H3K9me n'a pas été détecté. Ainsi, si la méthylation d'une histone est importante pour le ciblage de RITS à ces ARN, on peut aisément supposer que ce processus se déroule dans le noyau, à proximité de la chromatine comme pour le gène *mei4*, mais indétectable par CHIP. Une autre explication de l'importance de Clr4 dans le ciblage du gène *mei4* pourrait résider dans l'existence d'un rôle encore inconnu de cette protéine, tel que cela est suggéré par des travaux récents (Gerace et al., 2010 ; Zhang et al., 2011). Clr4 pourrait par exemple jouer un rôle structural de l'ensemble du complexe nucléoprotéique associant RITS à son ARN codant cible, ou méthyler une protéine de la voie permettant ainsi sa stabilisation ou son activation (du complexe Mmi1 ou du complexe RNAi/RITS ; Figure 48). Afin de d'évaluer l'importance de l'activité HMT de Clr4 dans le ciblage de *mei4* il suffirait de tester le recrutement de RITS dans un mutant de la sous-unité catalytique de Clr4.

Rôle de la RNase III Dicer1 et des petits ARNnc

Nos données montrent une importance plus modérée de la présence d'Ago1, Dcr1 et Rdp1 pour le recrutement de Chp1 à la fois à la chromatine et à l'ARN du gène *mei4*, suggérant ainsi une implication tout aussi mesurée des siARN produits par Dcr1 et Rdp1 s'associant à Ago1 (à la différence des péricentromères, Figure 1 de l'article). Cependant, nous n'avons pas testé la présence dans le complexe RITS de siARN complémentaires à la séquence du gène *mei4*, et aucune donnée ne suggère leur existence (Reinhart and Bartel, 2002 ; Buhler et al., 2008 ; Halic and Moazed, 2010). Il est possible que les analyses mises en œuvre pour identifier l'ensemble des siARN par séquençage massif n'aient pas permis de détecter ces petits ARN car ils sont difficiles à cloner, du fait de la présence de modifications biochimiques par exemple. Il serait instructif de vérifier dans un premier temps la présence de petits ARN associés à RITS et spécifiques de *mei4*, en effectuant une analyse par Southern blots à la sensibilité améliorée (Halic and Moazed, 2010) à partir de plusieurs régions du gène *mei4* et en utilisant pour sondes les siARN isolés du complexe RITS purifié, puis de déterminer si leur provenance est dépendante du RNAi, en testant l'implication de Dcr1 et Rdp1.

Cette différence que nous mettons en évidence avec le modèle établi pour les péricentromères pour l'importance de Dcr1 et Rdp1 au niveau de l'ARN *mei4*, évoque la

possibilité de l'existence d'une nouvelle classe de petits ARNnc pour ce gène, tels que les « primal small RNA » (priRNA) produits à partir des ARN dégradés par la machinerie de l'exosome (Halic and Moazed, 2010), à tester en renouvelant les expériences de Southern blot dans des mutants de l'exosome.

Par ailleurs, l'identification récente chez le champignon filamentueux *N. crassa* de petits ARN similaires aux miARN des mammifères dépendants de Dicer, et de petits ARN indépendants de Dicer ouvre de nouvelles pistes quant à la provenance d'éventuels petits ARN spécifiques de *mei4* (Lee et al., 2010). Ces travaux ont conduit notamment à la découverte de MRPL3, une nouvelle protéine contenant un domaine avec une activité de RNase III dont la séquence présente peu d'homologie avec les RNases III de mammifères Dicer et Drosha (Lee et al., 2010). L'homologue de la protéine MRPL3 chez *S. pombe* présente 26% d'identité avec celle de *N. crassa* (alignement de séquences avec l'outil Multalin, INRA Toulouse). D'autre part, *S. pombe* possède une troisième RNase III en plus de Dcr1 et de MRPL3, la protéine Pac1, qui présente 29% d'identité avec la RNase III humaine Drosha, essentielle et spécifique de la biogénèse des miARN (analyse BLAST et alignement Multalin). L'étude de l'association de Chp1 avec l'ARN et la chromatine de *mei4* (entre autres) dans un mutant déficient pour la protéine Mrpl3 ou Pac1 pourrait conduire à la mise en évidence de nouveaux petits ARN de type miARN chez *S. pombe*.

Une dernière possibilité serait que RITS ne contienne pas de petit ARN spécifique de *mei4*, ou pas plus que des petits ARN issus d'autres régions non ciblées ainsi considérés comme du bruit de fond. Dans ce deuxième cas, ces petits ARN pourraient alors simplement servir de stabilisateurs de la liaison entre RITS et l'ARN cible. La spécificité du ciblage serait alors apportée par un autre élément, tel que la protéine Mmi1 (discuté plus loin).

Rôle du promoteur de mei4 et du niveau de transcription

Nos résultats révèlent à la fois que la transcription, mais aussi que le niveau de transcription établi par le promoteur contrôlant l'expression du gène *mei4* joue un rôle essentiel pour le recrutement de Chp1 à la chromatine et à l'ARN du gène *mei4* (paragraphe 1.5.1. des résultats). Pour aller plus loin, il serait intéressant de tester cette dépendance à un niveau de transcription modéré pour d'autres gènes cibles de Chp1, en renouvelant les expériences de RIP dans des souches surexprimant ces gènes cibles. Le niveau de transcription pouvant également être important pour la présence de la marque H3K9me2,

nous souhaitons également analyser le statut de la chromatine du gène *mei4* dans nos mutants de la région promotrice de *mei4*.

De plus, l'ensemble de nos résultats est en faveur du modèle de recrutement de RITS à la chromatine de *mei4* par l'intermédiaire d'un ARN en cours de transcription (Figure 48). Pour compléter notre modèle, il faudrait vérifier que cet ARN naissant est produit par l'ARN polymérase II, en testant par exemple la présence de différentes sous-unités de cette polymérase par CHIP, et le recrutement de RITS à la chromatine de *mei4* dans des mutants de la polymérase comme cela a été fait pour les péricentromères (Kato et al., 2005 ; Djupedal et al., 2005).

Rôle de la séquence DSR du gène mei4

La séquence DSR de *mei4* est un élément supplémentaire absolument requis pour la présence de Chp1 à la chromatine et à l'ARN de ce gène (Figure 2B et S2A de l'article). Nous montrons également que cette séquence est suffisante pour recruter Chp1 à un ARN, grâce à deux systèmes rapporteurs indépendants (chapitre II des résultats). Dans le premier système, nous utilisons le gène rapporteur *ura4-dsr_{mei4}*. Nos tests de « silencing » de ce gène rapporteur indiquent que malgré le recrutement de Chp1 à l'ARN, le RNAi et Clr4 ne semblent pas jouer de rôle dans la mise en place du « silencing » dépendant de Mmi1 (Figure 44). Cependant, on ne peut exclure la possibilité que nos tests ne présentent pas une sensibilité suffisante pour détecter une implication modérée de ces processus dans la modulation de la maturation de cet ARN au cours du cycle végétatif, telle que nos données le suggèrent. Pour vérifier cette hypothèse, il suffirait de quantifier les niveaux d'ARN polyadénylés d'*ura4-dsr_{mei4}* dans des souches déficientes pour le RNAi, relativement à la souche sauvage, comme nous l'avons fait pour *mei4*.

Par ailleurs la possibilité que les ARN rapporteurs *ura4-dsr_{mei4}* et *ura4-gfp* activent la voie NMD (« nonsens mediated mRNA decay » ; Shyu et al., 2008) de par la position du codon stop dans ces constructions (Figure 42 A) serait assez limitée. En effet, nos données ne semblent pas corroborer avec l'activation de cette voie au niveau des ARN *ura4-dsr_{mei4}* ou *ura4-gfp* puisque les protéines Ura4 issues de ces ARN s'expriment et apparaissent fonctionnelles. De plus, des travaux publiés récemment montrent que pour des gènes sans

introns, la corrélation entre la distance du codon stop au 3'UTR et l'activation de la voie NMD est assez limitée. Seuls des codons stop positionnés en tout début de la CDS (codons 6 et 27) induisent une diminution du niveau d'ARN, à la différence d'un codon stop positionné à 309 nts (codon 140) du 3'UTR (Wen and Brogna, 2010). La deuxième construction *ura4*-dsr_{mei4}* permet à la fois de s'affranchir de toute possibilité de mise en place de NMD, et permet en plus de tester une autre hypothèse. En effet, les CHIP réalisées dans les souches *ura4-dsr_{mei4}* n'ont pas permis la détection de Chp1-TAP sur ce gène (Figure 43). La séquence DSR_{mei4} étant positionnée en aval du stop, à la différence des gènes *mei4* et *ssm4* tous deux ciblés à la chromatine par RITS, il peut être envisagé que la région DSR doit être positionnée dans la CDS du gène, suffisamment en amont du signal de polyadénylation. Ainsi, plus la région DSR est transcrite « tôt », plus elle offre de chances de recruter Mmi1 et RITS à la chromatine. Le fait que RITS ne soit pas recruté à la chromatine des deux autres gènes cibles de Mmi1 pour lesquels la région DSR a été identifiée, et qui est positionnée dans le 3'UTR, les gènes *rec8* et *spo5* (Figure 34 ; Harigaya et al., 2006) appuie cette hypothèse. La détection de Chp1 à la chromatine du gène rapporteur *ura4*-dsr_{mei4}* mais aussi de *gfp-dsr_{mei4}*, ainsi que l'identification des régions DSR de l'ensemble des gènes cibles, permettraient de confirmer cette hypothèse. La processivité de l'ARN polymérase II pourrait également jouer un rôle important dans le recrutement de ces machineries à la chromatine. Ainsi, des pauses pourraient favoriser leur stabilisation à la chromatine. Une autre possibilité permettant d'expliquer l'absence de recrutement de Chp1 à la chromatine du gène *ura4-dsr_{mei4}* serait que la séquence DSR utilisée dans nos deux systèmes serait trop minimale. Il serait intéressant de réitérer ces analyses dans un système comportant un enchaînement de motifs hexamériques UNAAAC reconnus spécifiquement par Mmi1.

Rôle de la protéine Mmi1

La protéine de liaison à l'ARN à domaine YTH, Mmi1, est absolument requise pour le « silencing » et le recrutement de Chp1 à la chromatine et à l'ARN de *mei4*, ainsi qu'à l'ARN des autres gènes méiotiques cibles (Figure 3F de l'article), alors qu'elle ne jouerait aucun rôle pour les régions d'hétérochromatine constitutive (Figure S2B de l'article). Mmi1 est elle-même associée à ces ARN méiotiques ciblés par Chp1 et à la chromatine de *mei4*. Ces données suggèrent pour Mmi1 un rôle de protéine dite « helper » (= qui aide) du RNAi, qui

recruterait RITS sur ses ARN cibles. Mmi1 pourrait en plus apporter la spécificité du ciblage de RITS vers les ARN de ces gènes codants. En effet le domaine YTH de la protéine du rat YT521-B reconnaît spécifiquement un motif hexamérique dégénéré, enrichi dans la séquence de ses ARN cibles (Zhang et al., 2010). Or nous mettons en évidence la présence d'un tel motif hexamérique dégénéré et répété (UNAAAC) dans la séquence de tous les ARN ciblés par Mmi1 et Chp1. Nous proposons un modèle dans lequel le domaine YTH de Mmi1 reconnaît spécifiquement un ARN de gène méiotique contenant une répétition de ce motif, pour y induire le recrutement de Chp1 (Figure 48). La présence de Chp1 sur ces ARN serait alors dépendante de l'association préalable de Mmi1 avec ces motifs, comme le suggèrent les résultats de la Figure 3F de l'article de recherche. Pour vérifier ce modèle, il serait intéressant de tester la présence de Chp1 dans des souches exprimant la protéine Mmi1 avec un domaine YTH non fonctionnel, tels que les mutants thermosensibles isolés par le groupe de M. Yamamoto (Harigaya et al., 2006). Dans ces mutants, la protéine Mmi1 est présente mais n'interagit plus avec ses ARN cibles.

Le modèle de Mmi1 comme élément de spécificité et protéine « helper » du complexe RITS implique une interaction directe ou non entre Mmi1 et RITS (Figure 48). Les différents essais de co-immunoprécipitation que nous avons menés jusqu'à présent révèlent une interaction physique entre Chp1 ou Ago1 et Mmi1 très faible ou trop labile pour être validée, suggérant une association indirecte (résultat non montré). Différents partenaires de Mmi1 ont à ce jour été identifiés, (paragraphe 3.2.3. de l'introduction), il serait donc judicieux de tester l'interaction entre RITS et ceux-ci. Par ailleurs, notre stratégie de système rapporteur consistant à forcer le recrutement de Mmi1 sur un ARN puis vérifier l'association subséquente de Chp1 à cet ARN n'a pas permis d'aboutir, en raison de la sensibilité de Mmi1 pour une étiquette en N-ter et en C-ter. Une dernière possibilité à tester pour cette stratégie de système rapporteur consisterait à insérer cette étiquette dans la séquence codante de Mmi1, et nous avons identifié deux sites potentiellement propices à cette insertion. Une fois construit et testé pour sa fonctionnalité, ce système pourrait permettre de mettre en évidence le recrutement de Chp1 par Mmi1, fortement suggéré par les résultats obtenus avec les deux autres systèmes rapporteurs utilisant la séquence DSR de *mei4* (*ura4-dsr_{mei4}* et *gfp-dsr_{mei4}* ; voir le paragraphe ci-dessus).

Nos résultats mettent ainsi en évidence un nouveau mécanisme de ciblage par le complexe RITS, dont la spécificité serait apportée par la protéine Mmi1, et qui serait propre aux gènes codants. A ce jour, l'ensemble des données publiées ne permet pas d'affirmer à ma connaissance que ce mode de recrutement du RNAi serait conservé chez d'autres eucaryotes. Cependant, chez *A. thaliana*, une première étude a montré que la protéine de liaison à l'ARN simple brin KTF1 est requise pour le « silencing » de transposons et interagit avec Ago4, suggérant que cette protéine pourrait être impliquée dans le recrutement d'Ago4 à un ARN en cours de polymérisation par l'ARN polymérase V pour y induire la méthylation de l'ADN (He et al., 2009). Ces données évoquent fortement notre modèle de ciblage d'ARN par RITS de manière dépendante de Mmi1. Cependant des travaux plus récents montrent que KTF1 et Ago4 peuvent être recrutée à la chromatine de manière indépendante l'une de l'autre, mettant ainsi en évidence une différence majeure avec notre modèle, puisque le recrutement de Chp1 nécessite lui la présence de Mmi1. Il est à noter que nous n'avons pas testé la dépendance de l'association d'Ago1 aux ARN cibles en l'absence de Mmi1. Bien que différentes protéines de liaison à l'ARN aient été identifiées chez d'autres eucaryotes pour leur rôle dans les mécanismes du RNAi, aucune étude ne suggère que ces protéines pourraient représenter un élément de spécificité essentiel au ciblage des ARN cibles par les protéines Argonautes, en plus du petit ARNnc. Ces protéines ont plutôt été impliquées dans la régulation de la biogénèse des petits ARN, telle que la protéine LIN-28 inhibant la production du miARN *let-7* chez *C. elegans* et les mammifères, jouant ainsi un rôle important dans le développement des embryons (pour revue Nimmo and Slack, 2009). D'autres facilitent le clivage des ARNdb précurseurs par Dicer, comme la protéine de liaison à l'ARNdb RDE-4 chez *C. elegans* (Parker et al., 2008), ou favorisent la prise en charge et/ou la maturation des petits ARN par les différentes Argonautes telles que R2D2 chez la drosophile (Okamura et al., 2011) et TRBP chez l'humain (Gredell et al., 2010).

En plus de la spécificité du ciblage des gènes méiotiques, Mmi1 permet également la mise en place de la diméthylation d'H3K9 au niveau du gène *mei4*, mais pas au niveau des péricentromères. En effet, l'inactivation de Mmi1 n'a aucun effet sur la présence de cette marque aux péricentromères. Par ailleurs, le recrutement de Mmi1 à la chromatine du gène *mei4* ne dépend que partiellement de Clr4 (non montré). On peut supposer que dans le cadre de gènes codants, la protéine Mmi1 recrute Clr4 soit directement soit par

l'intermédiaire de RITS. Pour déterminer l'ordre de ces événements, une possibilité serait de vérifier la présence de H3K9me au niveau de *mei4* dans une souche $\Delta chp1$. Si la méthylation est toujours présente, Clr4 serait recrutée par Mmi1 de manière indépendante de RITS, et dans le cas contraire, RITS pourrait recruter CLRC, son activité HMT étant nécessaire pour sa stabilisation à la chromatine (Figure 48).

Malgré son rôle majeur dans le ciblage de RITS et H3K9me et le « silencing » au niveau du gène *mei4*, Mmi1 ne serait pas impliquée dans le maintien de l'hétérochromatine aux régions d'hétérochromatine constitutive (Figure 2F et S2B de l'article de recherche). Il serait tout de même intéressant de tester l'implication de Mmi1 dans l'établissement *de novo* de l'hétérochromatine, en vérifiant dans un premier temps l'absence des marques de l'hétérochromatine dans des souches déficientes à la fois pour Mmi1 et Clr4, puis en analysant la présence de ces marques après réintroduction de Clr4 dans ces souches. Dans le cas où la présence de Clr4 ne suffit pas pour la remise en place de l'hétérochromatine en l'absence de Mmi1, celle-ci serait requise pour l'initiation de l'hétérochromatine.

La protéine Mmi1, assistée par le RNAi et Clr4, est donc essentielle pour le maintien du « silencing » du gène *mei4* et de ses autres gènes cibles, mais pas de l'hétérochromatine constitutive. Mmi1 permettrait ainsi d'établir une distinction entre la régulation des régions non codantes et des gènes codants par le RNAi et Clr4. Cette distinction pourrait être fondamentale notamment lors de la différenciation sexuelle, processus durant lequel les gènes méiotiques cibles du RNAi doivent s'exprimer, mais pas les régions d'hétérochromatine. L'inactivation de Mmi1 par le complexe Mei2-meARN permet la libération de la chromatine et des ARN de *mei4* à la fois de Mmi1 et de Chp1 (Figure S1 B et C de l'article de recherche). La structure d'hétérochromatine constitutive reste quant à elle intègre, permettant ainsi l'assemblage du kinétochore, des cohésines, et du bouquet télomérique, indispensable à la ségrégation correcte des chromosomes, ainsi que la maintenance du « silencing » de la région du déterminisme sexuel important entre autres pour la mise en place de la voie de signalisation par les phéromones de manière appropriée.

Importance d'autres éléments ?

A plus long terme cette étude pourra être poursuivie en explorant l'implication des protéines Eri1 (Iida et al., 2006) et Epe1 (introduction paragraphe 2.4.3.), qui ont été identifiés comme des régulateurs négatifs du RNAi. L'absence de ces protéines pourrait i) enrichir la présence de RITS au niveau de *mei4*, ii) perturber la régulation de l'expression de *mei4* au cours de la méiose. Pour ce faire, il serait intéressant de procéder à l'étude de ce mécanisme de régulation de gènes méiotique impliquant le RNAi dans des souches de *S. pombe* déficientes pour les gènes *eri1* ou *epe1*, et de comparer les résultats obtenus avant et après induction de la méiose.

2. Identification des gènes cibles de Chp1

Etude des gènes cibles de Mmi1

L'analyse du recrutement des protéines Mmi1 et Chp1 à la chromatine et à l'ARN des gènes méiotiques cibles de Mmi1 identifiés par le groupe de M. Yamamoto met en évidence une différence de comportement de ces deux éléments selon les gènes ciblés : certains seraient ciblés par ces deux protéines à la fois à la chromatine et à l'ARN (*mei4*, *ssm4* et *mug9*) et d'autres uniquement à l'ARN (*rec8*, *spo5*, *bqt1*, *dil1*, *crs1* et *mug1*). Par ailleurs la marque répressive H3K9me2 est également associée aux gènes *mei4*, *ssm4* et *mug9*, et ce de manière dépendante de Clr4 et Mmi1. Ces données suggèrent la mise en place d'un « silencing » au niveau co-transcriptionnel ou post-transcriptionnel *en cis* (au site de production de ces ARN) du même type que celui impliqué aux régions d'hétérochromatine constitutive. Dans ce cas, Mmi1 assisté par le RNAi et Clr4 pourrait agir soit sur un ARN en cours de polymérisation (mécanisme de « silencing » co-transcriptionnel), soit sur un ARN proche de son site de production « silencing » post-transcriptionnel *en cis*). Par ailleurs, nous pouvons envisager la possibilité de la mise en place d'une structure d'hétérochromatine facultative par l'action coordonnée du RNAi, de Clr4 et de Mmi1, au moins au niveau de ces trois gènes (Figure 48). Pour aller plus loin, il faudrait également tester la présence des deux autres protéines à chromodomaine caractéristiques de l'hétérochromatine, Swi6 et Chp2,

ainsi que l'accessibilité de l'ADN de ces gènes en procédant à des analyses de digestion par des endonucléases (de type DNase I ou micrococcale).

Le fait que la marque H3K9me2 ainsi que les protéines Chp1 et Mmi1 ne sont pas retrouvées à la chromatine de tous les gènes dont l'ARN est ciblé par Chp1 pourrait s'expliquer par différentes hypothèses déjà évoquées au début de cette discussion : le niveau de transcription, la processivité de l'ARN polymérase II, ou la position de la région DSR pourraient être des éléments critiques pour le ciblage de la chromatine.

Parmi les gènes méiotiques testés, le gène *meu1* semble être particulier : les protéines Chp1 et Mmi1 ne sont pas recrutées à la chromatine de ce gène, et pourtant la marque H3K9me y est enrichie de manière indépendante de Mmi1. Or, *meu1* est un gène orphelin pour lequel aucun homologue n'a pu être découvert, et n'ayant aucune fonction connue. Ce gène a été identifié lors d'un criblage visant à établir la liste des gènes exprimés spécifiquement au cours de la méiose (Watanabe et al., 2001). Cette étude révèle que ce gène produit deux populations d'ARN, nommées *meu1* et *meu2*, s'accumulant l'une après l'autre au cours du déroulement de la méiose. L'ARN *meu1* coderait pour la forme entière de la protéine Meu1, et *meu2* pour une forme tronquée de la partie N-ter. Le recrutement de Mmi1 et Chp1 à ces deux ARN n'a pas été testé, mais il est envisageable qu'ils ne soient en fait pas des cibles directes de ces deux protéines. Dans le cas contraire, deux autres possibilités seraient qu'un mécanisme de régulation supplémentaire partiellement indépendant de Mmi1, et restant à explorer pourrait être mis en jeu au niveau de la chromatine de ce gène *meu1*, ou bien que la régulation de l'expression de ce gène exercée par le RNAi et Clr4 serait prépondérante, à la différence des autres gènes testés. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser les niveaux d'expression de ce gène dans différentes souches déficientes pour les acteurs du RNAi ou pour Clr4.

Modèle prédictif du ciblage de Mmi1 et Chp1 par le motif hexamérique dégénéré

L'analyse des séquences des régions DSR des gènes *mei4*, *ssm4*, *rec8* et *spo5* et du gène *sme2* (codant pour meiARN), dont les ARN sont la cible de Mmi1, nous a permis de détecter l'enrichissement statistiquement significatif d'un motif hexamérique dégénéré (UNAAAC ; Figure 3 de l'article). Notre étude comparant le transcriptome d'une souche de *S.*

pombe déficiente pour Mmi1 à celui d'une souche sauvage nous a conduits à l'identification de 282 gènes codants ou non dont l'ARN s'accumule en l'absence de cette protéine, et qui sont donc potentiellement régulés par Mmi1. Une analyse plus poussée montre que Mmi1 et Chp1 sont toutes les deux recrutées sur l'ARN d'une partie de ces gènes, la plupart présentant dans leur séquence un enrichissement pour le motif UNAAAC. D'après nos données, le critère imposant la présence d'au moins six motifs hexamériques répartis dans une région de 850nts maximum d'un ARN méiotique permettrait de prédire de manière assez fiable que celui-ci sera la cible directe de Chp1 (17/18 ARN de gènes activés dans la phase de méiose « précoce » ; Figure 3 de l'article de recherche). Il serait intéressant de déterminer expérimentalement les conditions requises pour induire le ciblage de Mmi1 et RITS sur l'ARN, en termes de distribution et de nombre de motifs, en commençant par des expériences de retard sur gel.

Notre analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence 34 gènes répondant à ce critère de motif sur les 282 gènes dont l'ARN s'accumule en l'absence de Mmi1. Sur ces 34 gènes à motifs, 27 sont des gènes s'exprimant spécifiquement lors de la différenciation sexuelle, soit 79% des gènes à motif. Il serait intéressant de comparer ce biais de 79% que nous retrouvons dans notre étude pour la présence des motifs dans la séquence de gènes méiotiques avec la proportion de gènes méiotiques parmi les gènes de l'ensemble du génome répondant au critère de motif. Cette analyse aboutirait sur deux possibilités : i) soit la plupart des gènes à motifs sont méiotiques, et donc ce processus de régulation par Mmi1 et Chp1 serait spécifique de la méiose, ii) soit certains gènes à motif appartiennent à d'autres mécanismes, élargissant ainsi le rôle du RNAi et de Chp1 à la régulation d'autres processus biologiques.

Une étude pionnière publiée en 2005 par le groupe de G. Thon a conduit à l'identification de gènes ne présentant pas de biais pour une fonction biologique donnée, potentiellement régulés par le RNAi (introduction paragraphe 2.5. et Hansen et al., 2005). D'après notre analyse de l'ensemble de ces gènes, la majorité ne répondrait pas à notre critère de motif, suggérant qu'ils ne seraient pas régulés par un processus impliquant Mmi1, et donc que le RNAi pourrait réguler des gènes codants de manière indépendante de Mmi1.

L'ARNnc meiARN est ciblé par Mmi1 et le RNAi

Notre analyse transcriptomique révèle une accumulation très forte de l'ARNnc meiARN en l'absence de Mmi1, ainsi que l'association de Mmi1 à cet ARN, suggérant la régulation de son expression par le système Mmi1 (Figure 3C et 3D de l'article). Or cet ARN est impliqué dans l'inactivation de Mmi1 lors de la mise en place de la différenciation sexuelle (Harigaya et al., 2006). L'ARNnc meiARN pourrait ainsi exercer un rétrocontrôle de la protéine Mmi1. D'autre part, nos données montrent que cet ARN s'accumule assez fortement en l'absence du RNAi et de Clr4, révélant ainsi l'implication de ces acteurs dans la régulation de l'expression du gène *sme2* et la mise en place de ce rétrocontrôle (Figure 4B de l'article).

Nos données suggèrent que Mmi1 pourrait également être impliquée dans la régulation d'autres ARNnc (Figure 3C). En effet les ARNnc codés par les gènes *prl20*, *prl26*, *prl44*, *prl57*, *prl68*, *omt3*, et *tos3* s'accumulent dans la souche $\Delta mmi1$, dans une moindre mesure que meiARN. Tous ces ARNnc, dont le rôle n'est pas connu, ont été identifiés comme s'accumulant spécifiquement durant la différenciation sexuelle (Watanabe et al., 2001). D'après ces résultats, le rôle de Mmi1 ne serait pas restreint à l'inactivation d'ARN méiotiques codants : cette protéine, pourrait également inhiber des ARNnc issus de loci situés hors hétérochromatine, lors du cycle végétatif. Ces ARNnc s'accumulent lors de la différenciation sexuelle probablement après l'inactivation de Mmi1 par le complexe Mei2-meARN, tout comme les ARNnc codants cibles de Mmi1. De plus, le RNAi et Clr4 pourraient être impliqués dans la régulation de ces ARNnc de la même façon que meiARN, à vérifier par des expériences de RT-qPCR.

Rôle de la convergence ?

Chez *S. pombe*, environ 60% des gènes (codants ou non) seraient en situation de convergence transcriptionnelle. Plusieurs travaux suggèrent que le RNAi serait impliqué dans la régulation de la transcription antisens générée par la convergence (paragraphe 2.5. de l'introduction). Parmi les 282 gènes identifiés par notre étude transcriptomique, 59% sont

convergents. Cette proportion passe à 65% de gènes convergents sur les 34 gènes identifiés par notre étude et répondant au critère de motif, ce qui suggère un léger enrichissement en gènes convergents parmi les gènes cibles de Chp1. Toutefois, ce léger biais ne permet pas d'attribuer la présence de Chp1 sur ces ARN à la convergence, mais bien à l'enrichissement en motif hexamérique.

Identification d'autres gènes cibles de Mmi1 et / ou Chp1?

Notre étude visant à identifier les ARN ciblés directement par Mmi1 et / ou Chp1 pourrait être complétée par d'autres approches. Parmi celles-ci, une approche plus directe mais plus délicate à mettre en œuvre du point de vue technique consisterait à séquencer l'ensemble des ARN associés à Mmi1 et / ou Chp1 après leur purification à partir de cellules sauvages. Ce travail est en cours de réalisation dans l'équipe.

3. Rôle du RNAi et de Clr4 dans la régulation de ces gènes méiotiques

Nos différentes analyses révèlent que le RNAi et Clr4 exerceraient la régulation au niveau post-transcriptionnel de l'expression des gènes méiotiques ciblés de manière dépendante de Mmi1. Ainsi, l'absence de différents acteurs du RNAi ou de Clr4 induit une accumulation modérée d'ARN méiotiques polyadénylés, et épissés. Nous proposons que le RNAi et Clr4 coopèrent avec Mmi1 pour faciliter son inhibition de la maturation de ces ARN (Figure 48). Pour aller plus loin, il serait intéressant d'élargir nos analyses de l'épissage notamment à d'autres gènes épissés spécifiquement pendant la méiose, comme *rem1*, *spo4* et *mug137* (Moldon et al., 2008).

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette régulation par le RNAi et Clr4, dépendante de Mmi1 restent à élucider, et la poursuite de l'analyse des protéines interagissant avec Chp1 et Mmi1 (paragraphe 1 de la Discussion) pourrait fournir des indications précieuses. De manière intéressante, des résultats préliminaires révèlent une connexion potentielle entre Mmi1 et un processus de déadénylation des ARN.

L'ensemble de nos résultats indiquent que l'effet du RNAi et de Clr4 sur la régulation de gènes méiotiques pourrait avoir lieu au niveau post-transcriptionnel, et qu'il passerait par une inhibition de la maturation des ARN cibles, plutôt que par la dégradation de ces ARN, comme cela est le cas pour des régions non-codantes. Ces résultats dévoilent l'existence d'un nouveau mode d'action du RNAi et de Clr4, inédit chez la levure, impliquant potentiellement des mécanismes moléculaires similaires à ceux des miARN chez les mammifères. Ce mécanisme pourrait être considéré comme un processus ancestral qui se serait diversifié au cours de l'évolution des eucaryotes, donnant naissance aux mécanismes impliquant les siARN mais aussi les miARN et les piARN chez les eucaryotes supérieurs.

En parallèle de la voie miARN agissant chez les mammifères dans la régulation de la différenciation cellulaire (Introduction chapitre II), nous souhaitons explorer la possibilité que des mécanismes d'inhibition de la traduction soient également impliqués dans la régulation de la différenciation par le RNAi et Clr4, chez la levure. Dans cette optique, nous avons testé l'effet du RNAi ainsi que l'impact de Clr4, sur l'expression de différentes protéines chimères étiquetées avec une protéine fluorescente, ce qui nous permet de suivre l'expression de cette protéine dans les cellules. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus n'ont pas permis d'établir une connexion entre cette modification de la chromatine, ou le RNAi, et une inhibition traductionnelle. De plus, les résultats des tests de « silencing » obtenus avec le système rapporteur *ura4-dsr_{mei4}* ne semble pas indiquer la mise en place d'une telle régulation.

Enfin, dans le cadre de sa thèse, Leila Todeschini s'est intéressée à l'étude de l'implication du RNAi dans la mise en place de la différenciation sexuelle, aboutissant à la sporulation de la levure, et montre ainsi l'importance du RNAi dans ce processus biologique (voir la Figure 4D de l'article de recherche). L'effet délétère détecté sur la capacité de sporulation en l'absence du RNAi pourrait s'expliquer au niveau moléculaire à la fois par la perte de la structure d'hétérochromatine, et par la régulation de l'expression de gènes méiotiques, en particulier le gène *mei4*. En effet, il a été montré qu'Ago1 et Dcr1 sont importants pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, permettant la sortie du cycle végétatif nécessaire à la mise en place de la différenciation sexuelle, de manière indépendante de l'hétérochromatine. Ces deux acteurs du RNAi seraient impliqués, probablement de manière indirecte, dans la régulation de la phosphorylation de la kinase

Cdc2, régulateur central du cycle cellulaire mitotique et méiotique chez *S. pombe*. (Carmichael et al., 2004). Cdc2 doit être déphosphorylée pour débloquent l'arrêt en G1 et pour activer la phase S pré-méiotique puis les deux divisions nucléaires méiotiques. Cdc2 est déphosphorylée majoritairement par la tyrosine phosphatase Cdc25, et l'activation transcriptionnelle de *cdc25* requiert l'expression du gène *mei4* (Murakami-Tonami et al., 2007). Mei4 serait donc impliquée dans l'activation de Cdc2, tout comme Ago1 et Dcr1. A la lumière de nos résultats et de ces derniers éléments, nous émettons l'hypothèse que le RNAi pourrait contrôler le cycle cellulaire et la différenciation sexuelle principalement en réprimant l'expression de *mei4*. Je propose d'utiliser une approche génétique pour tester l'implication de *mei4* dans l'absence d'arrêt pré-méiotique observé dans les souches déficientes pour le RNAi. Brièvement, je suggère de comparer la capacité de la souche sauvage et des souches déficientes à la fois pour *mei4* et *ago1* ou pour *mei4* et *dcr1*, à induire la méiose. Nous nous attendons à ce que l'inactivation de *mei4* rétablisse le blocage du cycle cellulaire en phase G1.

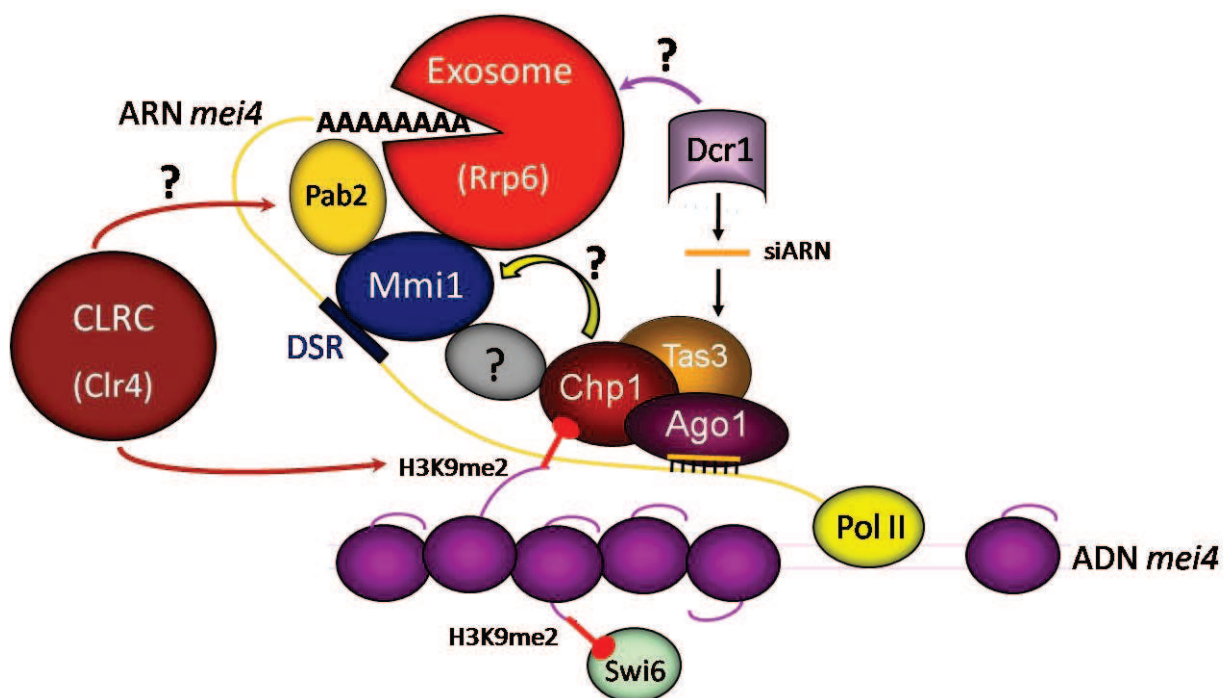


Figure 48. Modèle de la régulation du gène *mei4* par la protéine Mmi1 assistée par le RNAi et Clr4. Mmi1 s'associe spécifiquement aux motifs UNAAAC concentrés dans la séquence DSR de l'ARN du gène *mei4*. Mmi1 induirait alors le recrutement de RITS par l'intermédiaire d'une protéine inconnue (forme grise ?), permettant de stabiliser l'interaction de Mmi1 à l'ARN grâce à son siARN produit par Dcr1. RITS induit le recrutement de CLRC qui méthyle H3K9 (flèche rouge H3K9me2), ancrant ainsi

RITS à la chromatine et stabilisant l'association à l'ARN. Cette méthylation pourrait permettre d'initier la formation d'une structure de type hétérochromatine facultative avec, entre autres, le recrutement de Swi6. CLRC pourrait également méthyler un autre acteur de ce système de régulation (flèche rouge ?). Mmi1 recrute également Pab2 et l'exosome ainsi que tous les autres acteurs de cette régulation, pour inactiver l'ARNm de *mei4*. Le recrutement de ces différents éléments pourrait être favorisé par le RNAi ou CLRC (flèche pleine jaune ? et flèches rouge et mauve?). L'activité endonucléase de Dcr1, ainsi que l'activité « slicer » d'Ago1 pourrait jouer un rôle dans l'inactivation de l'ARNm *mei4* (flèche mauve ?).

L'ensemble de nos données tend à suggérer que l'importance du RNAi dans la régulation de gènes méiotiques codants est assez modérée à tous les niveaux testés, et serait toujours masquée par la régulation dominante par Mmi1. Ces travaux seront poursuivis avec pour objectif principal d'identifier la contribution réelle du RNAi ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu par le RNAi lors de la régulation de la différenciation cellulaire.

Conclusion

Nous mettons ainsi à jour une nouvelle fonction du RNAi chez *S. pombe*, en proposant une explication au niveau moléculaire : l'implication du RNAi dans la régulation de la différenciation sexuelle pourrait passer par la régulation de gènes méiotiques par l'intermédiaire de la protéine liant l'ARN, Mmi1. L'implication du RNAi dans la régulation de la gamétogénèse chez la plupart des eucaryotes (Introduction paragraphe 3.4.), ainsi que de protéines de liaison à l'ARN, les protéines DAZ (Introduction paragraphe 3.3.) est une coïncidence intéressante, bien que le lien entre ces deux mécanismes ne soit pas du tout établi. La compréhension des éléments importants pour cette régulation de la méiose chez *S. pombe* est essentielle, et pourrait aboutir à l'établissement d'un modèle prédictif et précis des cibles méiotiques du RNAi, qui pourrait être conservé au cours de l'évolution des eucaryotes. Par ailleurs, Mmi1 contient un domaine YTH conservé au cours de l'évolution, et qui a été impliqué dans l'épissage des ARNm chez l'humain, et dans la terminaison de la transcription et la polyadénylation chez les plantes (Imai et al., 1998 ; Hartmann et al., 1999 ; Stoilov et al., 2002 ; Zhang et al., 2010). Il serait intéressant d'explorer la connexion éventuelle entre ces protéines et le RNAi.

-Références bibliographiques-

- 1 - **Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., et al.** (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J* **18**, 1923-1938.
- 2 - **Abe, H., and Shimoda, C.** (2000). Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor *Mei4* and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* **154**, 1497-1508.
- 3 - **Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P.** (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev* **13**, 2148-2158.
- 4 - **Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Javerzat, J.P., and Cranston, G.** (1995). Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* **9**, 218-233.
- 5 - **Alvarez, B., and Moreno, S.** (2006). Fission yeast *Tor2* promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci* **119**, 4475-4485.
- 6 - **Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A.** (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**, 112-118.
- 7 - **Aono, T., Yanai, H., Miki, F., Davey, J., and Shimoda, C.** (1994). Mating pheromone-induced expression of the *mat1-Pm* gene of *Schizosaccharomyces pombe*: identification of signalling components and characterization of upstream controlling elements. *Yeast* **10**, 757-770.
- 8 - **Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., et al.** (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203-207.
- 9 - **Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J.** (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* **31**, 785-799.
- 10 - **Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M.** (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type lii. *J Exp Med* **79**, 137-158.
- 11 - **Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951.
- 12 - **Bannister, A.J., and Kouzarides, T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-395.
- 13 - **Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T.** (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.
- 14 - **Baron-Benhamou, J., Gehring, N.H., Kulozik, A.E., and Hentze, M.W.** (2004). Using the lambdaN peptide to tether proteins to RNAs. *Methods Mol Biol* **257**, 135-154.
- 15 - **Bayne, E.H., Portoso, M., Kagansky, A., Kos-Braun, I.C., Urano, T., Ekwall, K., Alves, F., Rappsilber, J., and Allshire, R.C.** (2008). Splicing factors facilitate RNAi-directed silencing in fission yeast. *Science* **322**, 602-606.

- 16 - Bayne, E.H., White, S.A., Kagansky, A., Bijos, D.A., Sanchez-Pulido, L., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Ponting, C.P., Rappsilber, J., *et al.* (2010). Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell* 140, 666-677.
- 17 - Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Sauliere, J., Wittkopp, N., and Izaurralde, E. (2007). mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* 581, 2845-2853.
- 18 - Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898.
- 19 - Beilharz, T.H., Humphreys, D.T., Clancy, J.L., Thermann, R., Martin, D.I., Hentze, M.W., and Preiss, T. (2009). microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6783.
- 20 - Beisel, C., and Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* 12, 123-135.
- 21 - Bernard, P., Drogat, J., Dheur, S., Genier, S., and Javerzat, J.P. (2010). Splicing factor Spf30 assists exosome-mediated gene silencing in fission yeast. *Mol Cell Biol* 30, 1145-1157.
- 22 - Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P., and Allshire, R.C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294, 2539-2542.
- 23 - Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- 24 - Birchler, J.A., Bhadra, M.P., and Bhadra, U. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr Opin Genet Dev* 10, 211-216.
- 25 - Bjerling, P., Silverstein, R.A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., and Ekwall, K. (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol Cell Biol* 22, 2170-2181.
- 26 - Black, B.E., Jansen, L.E., Maddox, P.S., Foltz, D.R., Desai, A.B., Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2007). Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain. *Mol Cell* 25, 309-322.
- 27 - Blumenstiel, J.P., Fu, R., Theurkauf, W.E., and Hawley, R.S. (2008). Components of the RNAi machinery that mediate long-distance chromosomal associations are dispensable for meiotic and early somatic homolog pairing in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180, 1355-1365.
- 28 - Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17, 170-180.
- 29 - Bonasio, R., Tu, S., and Reinberg, D. (2010). Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330, 612-616.
- 30 - Brar, G.A., and Amon, A. (2008). Emerging roles for centromeres in meiosis I chromosome segregation. *Nat Rev Genet* 9, 899-910.
- 31 - Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089-1103.
- 32 - Bresch, C., Muller, G., and Egel, R. (1968). Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Mol Gen Genet* 102, 301-306.
- 33 - Broach, J.R. (2004). Making the right choice--long-range chromosomal interactions in development. *Cell* 119, 583-586.
- 34 - Brock, W.A., Trostle, P.K., and Meistrich, M.L. (1980). Meiotic synthesis of testis histones in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 371-375.
- 35 - Brook, M., Smith, J.W., and Gray, N.K. (2009). The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* 137, 595-617.
- 36 - Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C., and Lin, H. (2007). *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev* 21, 2300-2311.

- 37 - **Buhler, M., Spies, N., Bartel, D.P., and Moazed, D.** (2008). TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1015-1023.
- 38 - **Buhler, M., Verdell, A., and Moazed, D.** (2006). Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. *Cell* 125, 873-886.
- 39 - **Buker, S.M., Iida, T., Buhler, M., Villen, J., Gygi, S.P., Nakayama, J., and Moazed, D.** (2007). Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nat Struct Mol Biol* 14, 200-207.
- 40 - **Buscaino, A., Allshire, R., and Pidoux, A.** (2010). Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr Opin Genet Dev* 20, 118-126.
- 41 - **Cairns, B.R.** (2007). Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol* 14, 989-996.
- 42 - **Cam, H., and Grewal, S.I.** (2004). RNA interference and epigenetic control of heterochromatin assembly in fission yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 419-427.
- 43 - **Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C., and Grewal, S.I.** (2005). Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet* 37, 809-819.
- 44 - **Canzio, D., Chang, E.Y., Shankar, S., Kuchenbecker, K.M., Simon, M.D., Madhani, H.D., Narlikar, G.J., and Al-Sady, B.** (2011). Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol Cell* 41, 67-81.
- 45 - **Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J.** (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12, 503-514.
- 46 - **Carmell, M.A., and Hannon, G.J.** (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11, 214-218.
- 47 - **Carmichael, J.B., Provost, P., Ekwall, K., and Hobman, T.C.** (2004). ago1 and dcr1, two core components of the RNA interference pathway, functionally diverge from rdp1 in regulating cell cycle events in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 15, 1425-1435.
- 48 - **Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J.** (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- 49 - **Castanotto, D., and Rossi, J.J.** (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457, 426-433.
- 50 - **Charon, C., Moreno, A.B., Bardou, F., and Crespi, M.** (2010). Non-protein-coding RNAs and their interacting RNA-binding proteins in the plant cell nucleus. *Mol Plant* 3, 729-739.
- 51 - **Chinen, M., Morita, M., Fukumura, K., and Tani, T.** (2010). Involvement of the spliceosomal U4 small nuclear RNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres. *J Biol Chem* 285, 5630-5638.
- 52 - **Chinnusamy, V., and Zhu, J.K.** (2009). RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Sci China C Life Sci* 52, 331-343.
- 53 - **Clapier, C.R., and Cairns, B.R.** (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.
- 54 - **Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F.** (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407-421.
- 55 - **Clift, D., and Marston, A.L.** (2011). The role of shugoshin in meiotic chromosome segregation. *Cytogenet Genome Res* 133, 234-242.
- 56 - **Collart, M.A., and Timmers, H.T.** (2004). The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 77, 289-322.
- 57 - **Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H.J., and Gray, N.K.** (2005). The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *EMBO J* 24, 2656-2666.

- 58 - **Conine, C.C., Batista, P.J., Gu, W., Claycomb, J.M., Chaves, D.A., Shirayama, M., and Mello, C.C.** (2010). Argonautes ALG-3 and ALG-4 are required for spermatogenesis-specific 26G-RNAs and thermotolerant sperm in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3588-3593.
- 59 - **Cooper, J.P., Watanabe, Y., and Nurse, P.** (1998). Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature* *392*, 828-831.
- 60 - **Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., and Lin, H.** (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* *12*, 3715-3727.
- 61 - **Cremona, N., Potter, K., and Wise, J.A.** (2011). A meiotic gene regulatory cascade driven by alternative fates for newly synthesized transcripts. *Mol Biol Cell* *22*, 66-77.
- 62 - **Debeauchamp, J.L., Moses, A., Noffsinger, V.J., Ulrich, D.L., Job, G., Kosinski, A.M., and Partridge, J.F.** (2008). Chp1-Tas3 interaction is required to recruit RITS to fission yeast centromeres and for maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell Biol* *28*, 2154-2166.
- 63 - **Dehe, P.M., and Cooper, J.P.** (2010). Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. *FEBS Lett* *584*, 3725-3733.
- 64 - **Deng, W., and Lin, H.** (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* *2*, 819-830.
- 65 - **Dernburg, A.F., Sedat, J.W., and Hawley, R.S.** (1996). Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* *86*, 135-146.
- 66 - **Dheur, S., Saupe, S.J., Genier, S., Vazquez, S., and Javerzat, J.P.** (2011). Role for cohesin in the formation of a heterochromatic domain at fission yeast subtelomeres. *Mol Cell Biol* *31*, 1088-1097.
- 67 - **Djupedal, I., Kos-Braun, I.C., Mosher, R.A., Soderholm, N., Simmer, F., Hardcastle, T.J., Fender, A., Heidrich, N., Kagansky, A., Bayne, E., et al.** (2009). Analysis of small RNA in fission yeast; centromeric siRNAs are potentially generated through a structured RNA. *EMBO J* *28*, 3832-3844.
- 68 - **Djupedal, I., Portoso, M., Spahr, H., Bonilla, C., Gustafsson, C.M., Allshire, R.C., and Ekwall, K.** (2005). RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev* *19*, 2301-2306.
- 69 - **Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P.** (2009). RNAi in budding yeast. *Science* *326*, 544-550.
- 70 - **Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Seraphin, B.** (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 15-22.
- 71 - **Egel, R.** (2004). *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces Pombe: Genetics, Genomics, and Beyond.*
- 72 - **Egel, R.** (2005). Fission yeast mating-type switching: programmed damage and repair. *DNA Repair (Amst)* *4*, 525-536.
- 73 - **Eirin-Lopez, J.M., and Ausio, J.** (2011). Boule and the Evolutionary Origin of Metazoan Gametogenesis: A Grandpa's Tale. *Int J Evol Biol* *2011*, 972457.
- 74 - **Ekwall, K., Nimmo, E.R., Javerzat, J.P., Borgstrom, B., Egel, R., Cranston, G., and Allshire, R.** (1996). Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein *Swi6p* and impair centromere function. *J Cell Sci* *109 (Pt 11)*, 2637-2648.
- 75 - **Ellermeier, C., Higuchi, E.C., Phadnis, N., Holm, L., Geelhood, J.L., Thon, G., and Smith, G.R.** (2010). RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 8701-8705.
- 76 - **Emmerth, S., Schober, H., Gaidatzis, D., Roloff, T., Jacobsen, K., and Buhler, M.** (2010). Nuclear retention of fission yeast *dicer* is a prerequisite for RNAi-mediated heterochromatin assembly. *Dev Cell* *18*, 102-113.
- 77 - **Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E.** (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* *27*, 3970-3981.
- 78 - **Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E.** (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 346-353.

- 79 - Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 35, 868-880.
- 80 - Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351-379.
- 81 - Fagegaltier, D., Bouge, A.L., Berry, B., Poisot, E., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., Theodore, L., Voinnet, O., and Antoniewski, C. (2009). The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21258-21263.
- 82 - Fawcett, D.W. (1981). *The cell. 2d ed edition*, viii, 862p.
- 83 - Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- 84 - Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., *et al.* (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* 143, 212-224.
- 85 - Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S.S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- 86 - Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.
- 87 - Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 17, 1870-1881.
- 88 - Fisher, C.L., and Fisher, A.G. (2011). Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr Opin Genet Dev* 21, 140-146.
- 89 - Fodor, B.D., Shukeir, N., Reuter, G., and Jenuwein, T. (2010). Mammalian Su(var) genes in chromatin control. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 471-501.
- 90 - Forsburg, S.L., and Nurse, P. (1991). Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 7, 227-256.
- 91 - Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 6, 784-791.
- 92 - Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* 121, 961-976.
- 93 - Garzon, R., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60, 167-179.
- 94 - Gent, J.I., Schvarzstein, M., Villeneuve, A.M., Gu, S.G., Jantsch, V., Fire, A.Z., and Baudrimont, A. (2009). A *Caenorhabditis elegans* RNA-directed RNA polymerase in sperm development and endogenous RNA interference. *Genetics* 183, 1297-1314.
- 95 - Gerace, E.L., Halic, M., and Moazed, D. (2010). The methyltransferase activity of Clr4Suv39h triggers RNAi independently of histone H3K9 methylation. *Mol Cell* 39, 360-372.
- 96 - Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Carmell, M.A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199-202.
- 97 - Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- 98 - Gotta, M., and Gasser, S.M. (1996). Nuclear organization and transcriptional silencing in yeast. *Experientia* 52, 1136-1147.
- 99 - Gredell, J.A., Dittmer, M.J., Wu, M., Chan, C., and Walton, S.P. (2010). Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry* 49, 3148-3155.
- 100 - Grewal, S.I., and Elgin, S.C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399-406.
- 101 - Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
- 102 - Grewal, S.I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.

- 103 - **Grishok, A., Sinskey, J.L., and Sharp, P.A.** (2005). Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev* 19, 683-696.
- 104 - **Guang, S., Bochner, A.F., Burkhart, K.B., Burton, N., Pavelec, D.M., and Kennedy, S.** (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature* 465, 1097-1101.
- 105 - **Gullerova, M., Moazed, D., and Proudfoot, N.J.** (2011). Autoregulation of convergent RNAi genes in fission yeast. *Genes Dev* 25, 556-568.
- 106 - **Gullerova, M., and Proudfoot, N.J.** (2008). Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*. *Cell* 132, 983-995.
- 107 - **Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C.** (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587-1590.
- 108 - **Gutz, H., and Doe, F.J.** (1973). Two Different h Mating Types in SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. *Genetics* 74, 563-569.
- 109 - **Haldar, S., Saini, A., Nanda, J.S., Saini, S., and Singh, J.** (2011). Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem* 286, 9308-9320.
- 110 - **Halic, M., and Moazed, D.** (2010). Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell* 140, 504-516.
- 111 - **Hall, I.M., Noma, K., and Grewal, S.I.** (2003). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 193-198.
- 112 - **Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., and Grewal, S.I.** (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297, 2232-2237.
- 113 - **Hammell, C.M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C.V., Stutz, F., Moore, C., and Cole, C.N.** (2002). Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol Cell Biol* 22, 6441-6457.
- 114 - **Han, J., Kim, D., and Morris, K.V.** (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12422-12427.
- 115 - **Han, T., Manoharan, A.P., Harkins, T.T., Bouffard, P., Fitzpatrick, C., Chu, D.S., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., and Kim, J.K.** (2009). 26G endo-siRNAs regulate spermatogenic and zygotic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18674-18679.
- 116 - **Hansen, K.R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T.A., Martienssen, R.A., Bahler, J., and Thon, G.** (2005). Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. *Mol Cell Biol* 25, 590-601.
- 117 - **Hansen, K.R., Ibarra, P.T., and Thon, G.** (2006). Evolutionary-conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. *Nucleic Acids Res* 34, 78-88.
- 118 - **Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M.** (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45-50.
- 119 - **Hartmann, A.M., Nayler, O., Schwaiger, F.W., Obermeier, A., and Stamm, S.** (1999). The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn). *Mol Biol Cell* 10, 3909-3926.
- 120 - **Hatanaka, M., and Shimoda, C.** (2001). The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 207-217.
- 121 - **Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V., and Morris, K.V.** (2009). Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 37, 2984-2995.
- 122 - **Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovskiy, A., Miska, E.A., et al.** (2008). MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 3, e1738.

- 123 - **He, X.J., Chen, T., and Zhu, J.K.** (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21, 442-465.
- 124 - **He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H., and Zhu, J.K.** (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498-508.
- 125 - **Higuchi, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (2002). Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1-11.
- 126 - **Hime, G.R., and Somers, W.G.** (2009). Micro-RNA mediated regulation of proliferation, self-renewal and differentiation of mammalian stem cells. *Cell Adh Migr* 3, 425-432.
- 127 - **Hirasawa, R., and Feil, R.** (2010). Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem* 48, 187-200.
- 128 - **Hong, E.J., Villen, J., Gerace, E.L., Gygi, S.P., and Moazed, D.** (2005). A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation. *RNA Biol* 2, 106-111.
- 129 - **Horie, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Nishiwaki, S., Fujioka, H., Abe, H., Yamamoto, M., and Shimoda, C.** (1998). The *Schizosaccharomyces pombe* mei4+ gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 18, 2118-2129.
- 130 - **Horn, P.J., Bastie, J.N., and Peterson, C.L.** (2005). A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Genes Dev* 19, 1705-1714.
- 131 - **Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D.** (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 529-539.
- 132 - **Houwing, S., Berezikov, E., and Ketting, R.F.** (2008). Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J* 27, 2702-2711.
- 133 - **Iida, T., Kawaguchi, R., and Nakayama, J.** (2006). Conserved ribonuclease, Eri1, negatively regulates heterochromatin assembly in fission yeast. *Curr Biol* 16, 1459-1464.
- 134 - **Iida, T., Nakayama, J., and Moazed, D.** (2008). siRNA-mediated heterochromatin establishment requires HP1 and is associated with antisense transcription. *Mol Cell* 31, 178-189.
- 135 - **Iino, Y., and Yamamoto, M.** (1985). Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2447-2451.
- 136 - **Imai, Y., Matsuo, N., Ogawa, S., Tohyama, M., and Takagi, T.** (1998). Cloning of a gene, YT521, for a novel RNA splicing-related protein induced by hypoxia/reoxygenation. *Brain Res Mol Brain Res* 53, 33-40.
- 137 - **Irvine, D.V., Zaratiegui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L., and Martienssen, R.A.** (2006). Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science* 313, 1134-1137.
- 138 - **Isaac, S., Walfridsson, J., Zohar, T., Lazar, D., Kahan, T., Ekwall, K., and Cohen, A.** (2007). Interaction of Epe1 with the heterochromatin assembly pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 175, 1549-1560.
- 139 - **Javerzat, J.P.** (2010). Molecular biology. Directing the centromere guardian. *Science* 327, 150-151.
- 140 - **Jenuwein, T., and Allis, C.D.** (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- 141 - **Jia, S., Noma, K., and Grewal, S.I.** (2004). RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science* 304, 1971-1976.
- 142 - **Jinek, M., and Doudna, J.A.** (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405-412.
- 143 - **Kalantry, S.** (2011). Recent advances in X-chromosome inactivation. *J Cell Physiol* 226, 1714-1718.
- 144 - **Kaneda, M., Tang, F., O'Carroll, D., Lao, K., and Surani, M.A.** (2009). Essential role for Argonaute2 protein in mouse oogenesis. *Epigenetics Chromatin* 2, 9.

- 145 - **Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K.** (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* *19*, 489-501.
- 146 - **Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T., and Ishikawa, F.** (2005). Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. *Curr Biol* *15*, 1808-1819.
- 147 - **Kato, H., Goto, D.B., Martienssen, R.A., Urano, T., Furukawa, K., and Murakami, Y.** (2005). RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science* *309*, 467-469.
- 148 - **Kawamata, T., and Tomari, Y.** (2010). Making RISC. *Trends Biochem Sci* *35*, 368-376.
- 149 - **Kawasaki, H., and Taira, K.** (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* *431*, 211-217.
- 150 - **Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., and Watanabe, Y.** (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* *327*, 172-177.
- 151 - **Kellum, R., and Alberts, B.M.** (1995). Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* *108* (Pt 4), 1419-1431.
- 152 - **Ketting, R.F.** (2011). The many faces of RNAi. *Dev Cell* *20*, 148-161.
- 153 - **Khalil, A.M., and Driscoll, D.J.** (2010). Epigenetic regulation of pericentromeric heterochromatin during mammalian meiosis. *Cytogenet Genome Res* *129*, 280-289.
- 154 - **Kim, D.H., Saetrom, P., Snove, O., Jr., and Rossi, J.J.** (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16230-16235.
- 155 - **Kim, D.H., Villeneuve, L.M., Morris, K.V., and Rossi, J.J.** (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 793-797.
- 156 - **Kim, G.J., Georg, I., Scherthan, H., Merckenschlager, M., Guillou, F., Scherer, G., and Barrionuevo, F.** (2010). Dicer is required for Sertoli cell function and survival. *Int J Dev Biol* *54*, 867-875.
- 157 - **Kim, H.S., Choi, E.S., Shin, J.A., Jang, Y.K., and Park, S.D.** (2004). Regulation of Swi6/HP1-dependent heterochromatin assembly by cooperation of components of the mitogen-activated protein kinase pathway and a histone deacetylase Clr6. *J Biol Chem* *279*, 42850-42859.
- 158 - **Kitamura, K., Katayama, S., Dhut, S., Sato, M., Watanabe, Y., Yamamoto, M., and Toda, T.** (2001). Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev Cell* *1*, 389-399.
- 159 - **Kjaerulff, S., Lautrup-Larsen, I., Truelsén, S., Pedersen, M., and Nielsen, O.** (2005). Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* *25*, 2045-2059.
- 160 - **Klattenhoff, C., Bratu, D.P., McGinnis-Schultz, N., Koppetsch, B.S., Cook, H.A., and Theurkauf, W.E.** (2007). *Drosophila* rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. *Dev Cell* *12*, 45-55.
- 161 - **Klattenhoff, C., and Theurkauf, W.** (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* *135*, 3-9.
- 162 - **Kloc, A., and Martienssen, R.** (2008). RNAi, heterochromatin and the cell cycle. *Trends Genet* *24*, 511-517.
- 163 - **Konkel, M.K., and Batzer, M.A.** (2010). A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome. *Semin Cancer Biol* *20*, 211-221.
- 164 - **Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
- 165 - **Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., and Yamamoto, M.** (2000). A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast ste11(+) gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell* *11*, 3205-3217.
- 166 - **Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al.** (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* *131*, 839-849.

- 167 - Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., *et al.* (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22, 908-917.
- 168 - Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- 169 - Lardenois, A., Liu, Y., Walther, T., Chalmel, F., Evrard, B., Granovskaia, M., Chu, A., Davis, R.W., Steinmetz, L.M., and Primig, M. (2011). Execution of the meiotic noncoding RNA expression program and the onset of gametogenesis in yeast require the conserved exosome subunit Rps6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1058-1063.
- 170 - Latham, J.A., and Dent, S.Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1017-1024.
- 171 - Lau, N.C., Ohsumi, T., Borowsky, M., Kingston, R.E., and Blower, M.D. (2009). Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi. *EMBO J* 28, 2945-2958.
- 172 - Lechner, M.S., Schultz, D.C., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher, F.J., 3rd (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 929-937.
- 173 - Lee, H.C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S.K., Pertsemliadis, A., Lewis, Z.A., Freitag, M., Selker, E.U., Mello, C.C., *et al.* (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell* 38, 803-814.
- 174 - Lee, T.L., Pang, A.L., Rennert, O.M., and Chan, W.Y. (2009). Genomic landscape of developing male germ cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87, 43-63.
- 175 - Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- 176 - Li, C., Vagin, V.V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., Seitz, H., Horwich, M.D., Syrzycka, M., Honda, B.M., *et al.* (2009). Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* 137, 509-521.
- 177 - Li, G., and Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 21, 175-186.
- 178 - Li, Y., Liu, X., Huang, L., Guo, H., and Wang, X.J. (2010). Potential coexistence of both bacterial and eukaryotic small RNA biogenesis and functional related protein homologs in Archaea. *J Genet Genomics* 37, 493-503.
- 179 - Lin, H., and Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124, 2463-2476.
- 180 - Lippman, Z., Gendrel, A.V., Black, M., Vaughn, M.W., Dedhia, N., McCombie, W.R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K.D., *et al.* (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430, 471-476.
- 181 - Liu, H., Tang, Y., He, Z., and Rosenwaks, Z. (2010). Dicer is a key player in oocyte maturation. *J Assist Reprod Genet* 27, 9-10.
- 182 - Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004a). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- 183 - Liu, J., He, Y., Amasino, R., and Chen, X. (2004b). siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18, 2873-2878.
- 184 - Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* 1677, 3-11.
- 185 - Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- 186 - Ma, J., Flemr, M., Stein, P., Berninger, P., Malik, R., Zavolan, M., Svoboda, P., and Schultz, R.M. (2010). MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr Biol* 20, 265-270.
- 187 - Ma, J., Wing, R.A., Bennetzen, J.L., and Jackson, S.A. (2007). Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends Genet* 23, 134-139.

- 188 - **Maatouk, D.M., Loveland, K.L., McManus, M.T., Moore, K., and Harfe, B.D.** (2008). Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod* 79, 696-703.
- 189 - **Maine, E.M., Hauth, J., Ratliff, T., Vought, V.E., She, X., and Kelly, W.G.** (2005). EGO-1, a putative RNA-dependent RNA polymerase, is required for heterochromatin assembly on unpaired dna during *C. elegans* meiosis. *Curr Biol* 15, 1972-1978.
- 190 - **Maison, C., and Almouzni, G.** (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 296-304.
- 191 - **Makarova, K.S., Wolf, Y.I., van der Oost, J., and Koonin, E.V.** (2009). Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct* 4, 29.
- 192 - **Mandell, J.G., Goodrich, K.J., Bahler, J., and Cech, T.R.** (2005). Expression of a RecQ helicase homolog affects progression through crisis in fission yeast lacking telomerase. *J Biol Chem* 280, 5249-5257.
- 193 - **Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J.** (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* 11, 181-190.
- 194 - **Martinez, P., and Blasco, M.A.** (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer* 11, 161-176.
- 195 - **Mata, J., and Bahler, J.** (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15517-15522.
- 196 - **Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J.** (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32, 143-147.
- 197 - **Mata, J., Wilbrey, A., and Bahler, J.** (2007). Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* 8, R217.
- 198 - **Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., and Muchardt, C.** (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep* 5, 490-496.
- 199 - **Matzke, M.A., and Birchler, J.A.** (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6, 24-35.
- 200 - **Maudrell, K.** (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-10864.
- 201 - **McPheeters, D.S., Cremona, N., Sunder, S., Chen, H.M., Averbek, N., Leatherwood, J., and Wise, J.A.** (2009). A complex gene regulatory mechanism that operates at the nexus of multiple RNA processing decisions. *Nat Struct Mol Biol* 16, 255-264.
- 202 - **Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., and Dietz, H.C.** (2000). Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol Cell Biol* 20, 8944-8957.
- 203 - **Moazed, D.** (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420.
- 204 - **Mogridge, J., Mah, T.F., and Greenblatt, J.** (1995). A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the lambda N protein. *Genes Dev* 9, 2831-2845.
- 205 - **Moldon, A., Malapeira, J., Gabrielli, N., Gogol, M., Gomez-Escoda, B., Ivanova, T., Seidel, C., and Ayte, J.** (2008). Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature* 455, 997-1000.
- 206 - **Morris, K.V., Chan, S.W., Jacobsen, S.E., and Looney, D.J.** (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289-1292.
- 207 - **Morrison, D.K.** (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19, 16-23.
- 208 - **Motamedi, M.R., Hong, E.J., Li, X., Gerber, S., Denison, C., Gygi, S., and Moazed, D.** (2008). HP1 proteins form distinct complexes and mediate heterochromatic gene silencing by nonoverlapping mechanisms. *Mol Cell* 32, 778-790.

- 209 - **Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Moazed, D.** (2004). Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* *119*, 789-802.
- 210 - **Murakami-Tonami, Y., Yamada-Namikawa, C., Tochigi, A., Hasegawa, N., Kojima, H., Kunimatsu, M., Nakanishi, M., and Murakami, H.** (2007). Mei4p coordinates the onset of meiosis I by regulating *cdc25+* in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 14688-14693.
- 211 - **Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J.** (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 12135-12140.
- 212 - **Murchison, E.P., Stein, P., Xuan, Z., Pan, H., Zhang, M.Q., Schultz, R.M., and Hannon, G.J.** (2007). Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* *21*, 682-693.
- 213 - **Nakagawa, H., Lee, J.K., Hurwitz, J., Allshire, R.C., Nakayama, J., Grewal, S.I., Tanaka, K., and Murakami, Y.** (2002). Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev* *16*, 1766-1778.
- 214 - **Nakase, Y., Hirata, A., Shimoda, C., and Nakamura, T.** (2009). Ectopic overproduction of a sporulation-specific transcription factor induces assembly of prespore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast. *Genetics* *183*, 1195-1199.
- 215 - **Nicholson, A.W.** (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* *23*, 371-390.
- 216 - **Nicol, J.W., Helt, G.A., Blanchard, S.G., Jr., Raja, A., and Loraine, A.E.** (2009). The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* *25*, 2730-2731.
- 217 - **Nimmo, R.A., and Slack, F.J.** (2009). An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer. *Chromosoma* *118*, 405-418.
- 218 - **Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D., and Grewal, S.I.** (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet* *36*, 1174-1180.
- 219 - **Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I., and Watanabe, Y.** (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* *4*, 89-93.
- 220 - **Nonomura, K., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., and Kurata, N.** (2007). A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* *19*, 2583-2594.
- 221 - **Nowotny, M., and Yang, W.** (2009). Structural and functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol* *19*, 286-293.
- 222 - **Nurse, P.** (1985). Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation. *Mol Gen Genet* *198*, 497-502.
- 223 - **Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., and Yanagida, M.** (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol* *6*, 1135-1141.
- 224 - **Ohnacker, M., Barabino, S.M., Preker, P.J., and Keller, W.** (2000). The WD-repeat protein pfs2p bridges two essential factors within the yeast pre-mRNA 3'-end-processing complex. *EMBO J* *19*, 37-47.
- 225 - **Ohnacker, M., Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W.** (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* *pla1* gene encodes a poly(A) polymerase and can functionally replace its *Saccharomyces cerevisiae* homologue. *Nucleic Acids Res* *24*, 2585-2591.
- 226 - **Okamura, K., and Lai, E.C.** (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 673-678.
- 227 - **Okamura, K., Robine, N., Liu, Y., Liu, Q., and Lai, E.C.** (2011). R2D2 organizes small regulatory RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* *31*, 884-896.
- 228 - **Olins, D.E., and Olins, A.L.** (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 809-814.

- 229 - **Olivieri, D., Sykora, M.M., Sachidanandam, R., Mechtler, K., and Brennecke, J.** (2010). An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J* 29, 3301-3317.
- 230 - **Olmedo-Monfil, V., Duran-Figueroa, N., Arteaga-Vazquez, M., Demesa-Arevalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., and Vielle-Calzada, J.P.** (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464, 628-632.
- 231 - **Orban, T.I., and Izaurralde, E.** (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459-469.
- 232 - **Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A., and Elgin, S.C.** (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303, 669-672.
- 233 - **Papaioannou, M.D., Pitetti, J.L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., Vejnar, C.E., Kuhne, F., Descombes, P., Zdobnov, E.M., et al.** (2009). Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 326, 250-259.
- 234 - **Parker, G.S., Maity, T.S., and Bass, B.L.** (2008). dsRNA binding properties of RDE-4 and TRBP reflect their distinct roles in RNAi. *J Mol Biol* 384, 967-979.
- 235 - **Partridge, J.F., DeBeauchamp, J.L., Kosinski, A.M., Ulrich, D.L., Hadler, M.J., and Noffsinger, V.J.** (2007). Functional separation of the requirements for establishment and maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell* 26, 593-602.
- 236 - **Partridge, J.F., Scott, K.S., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Allshire, R.C.** (2002). cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol* 12, 1652-1660.
- 237 - **Pavelec, D.M., Lachowicz, J., Duchaine, T.F., Smith, H.E., and Kennedy, S.** (2009). Requirement for the ERI/DICER complex in endogenous RNA interference and sperm development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 183, 1283-1295.
- 238 - **Perreault, A., Lemieux, C., and Bachand, F.** (2007). Regulation of the nuclear poly(A)-binding protein by arginine methylation in fission yeast. *J Biol Chem* 282, 7552-7562.
- 239 - **Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al.** (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12, 1577-1589.
- 240 - **Petrie, V.J., Wuitschick, J.D., Givens, C.D., Kosinski, A.M., and Partridge, J.F.** (2005). RNA interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 chromodomain protein with distinct heterochromatic loci in fission yeast. *Mol Cell Biol* 25, 2331-2346.
- 241 - **Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J.G.** (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol* 30, 1486-1494.
- 242 - **Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W.** (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576.
- 243 - **Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W.** (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17, 118-126.
- 244 - **Plohl, M., Luchetti, A., Mestrovic, N., and Mantovani, B.** (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409, 72-82.
- 245 - **Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G.** (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* 19, 625-638.
- 246 - **Rae, M.M., and Franke, W.W.** (1972). The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin in mouse nuclei. *Chromosoma* 39, 443-456.
- 247 - **Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al.** (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.

- 248 - **Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E.** (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* *11*, 1640-1647.
- 249 - **Reinhart, B.J., and Bartel, D.P.** (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* *297*, 1831.
- 250 - **Rodriguez-Gabriel, M.A., Watt, S., Bahler, J., and Russell, P.** (2006). Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol Cell Biol* *26*, 6347-6356.
- 251 - **Roudier, F., Ahmed, I., Berard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., Al-Shikhley, L., et al.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J* *30*, 1928-1938.
- 252 - **Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A.C., Franco, B., Robine, N., Lai, E.C., Pelisson, A., and Simonelig, M.** (2010). Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early Drosophila embryo. *Nature* *467*, 1128-1132.
- 253 - **Rowley, M.J., Avrutsky, M.I., Sifuentes, C.J., Pereira, L., and Wierzbicki, A.T.** (2011). Independent Chromatin Binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 Mediates Transcriptional Gene Silencing. *PLoS Genet* *7*, e1002120.
- 254 - **Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., and Nakayama, J.** (2004). A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast. *EMBO J* *23*, 3825-3835.
- 255 - **Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Arisaka, F., Tanaka, K., Shirahige, K., and Nakayama, J.** (2008). Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol* *28*, 6973-6988.
- 256 - **Saito, K., and Siomi, M.C.** (2010). Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev Cell* *19*, 687-697.
- 257 - **Samejima, I., Mackie, S., and Fantes, P.A.** (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* *16*, 6162-6170.
- 258 - **Santenard, A., and Torres-Padilla, M.E.** (2009). Epigenetic reprogramming in mammalian reproduction: contribution from histone variants. *Epigenetics* *4*, 80-84.
- 259 - **Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.E.** (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* *12*, 853-862.
- 260 - **Sato, M., Shinozaki-Yabana, S., Yamashita, A., Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (2001). The fission yeast meiotic regulator Mei2p undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *FEBS Lett* *499*, 251-255.
- 261 - **Sato, M., Watanabe, Y., Akiyoshi, Y., and Yamamoto, M.** (2002). 14-3-3 protein interferes with the binding of RNA to the phosphorylated form of fission yeast meiotic regulator Mei2p. *Curr Biol* *12*, 141-145.
- 262 - **Schalch, T., Job, G., Noffsinger, V.J., Shanker, S., Kuscu, C., Joshua-Tor, L., and Partridge, J.F.** (2009). High-affinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin. *Mol Cell* *34*, 36-46.
- 263 - **Schueler, M.G., and Sullivan, B.A.** (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *7*, 301-313.
- 264 - **Shankaranarayana, G.D., Motamedi, M.R., Moazed, D., and Grewal, S.I.** (2003). Sir2 regulates histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Curr Biol* *13*, 1240-1246.
- 265 - **She, X., Xu, X., Fedotov, A., Kelly, W.G., and Maine, E.M.** (2009). Regulation of heterochromatin assembly on unpaired chromosomes during *Caenorhabditis elegans* meiosis by components of a small RNA-mediated pathway. *PLoS Genet* *5*, e1000624.
- 266 - **Shen, B., and Goodman, H.M.** (2004). Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* *306*, 997.

- 267 - **Shimada, T., Yamashita, A., and Yamamoto, M.** (2003). The fission yeast meiotic regulator Mei2p forms a dot structure in the horse-tail nucleus in association with the *sme2* locus on chromosome II. *Mol Biol Cell* *14*, 2461-2469.
- 268 - **Shobuike, T., Tatebayashi, K., Tani, T., Sugano, S., and Ikeda, H.** (2001). The *dhp1(+)* gene, encoding a putative nuclear 5'→3' exoribonuclease, is required for proper chromosome segregation in fission yeast. *Nucleic Acids Res* *29*, 1326-1333.
- 269 - **Shyu, A.B., Wilkinson, M.F., and van Hoof, A.** (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J* *27*, 471-481.
- 270 - **Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* *107*, 465-476.
- 271 - **Simmer, F., Buscaino, A., Kos-Braun, I.C., Kagansky, A., Boukaba, A., Urano, T., Kerr, A.R., and Allshire, R.C.** (2010). Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in trans in fission yeast. *EMBO Rep* *11*, 112-118.
- 272 - **Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A.A.** (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 246-258.
- 273 - **Slotkin, R.K., and Martienssen, R.** (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* *8*, 272-285.
- 274 - **Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijo, J.A., and Martienssen, R.A.** (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* *136*, 461-472.
- 275 - **Sparvoli, E., Galli, M.G., Chiantante, D., and Sgorbati, S.** (1977). Perinuclear DNA and heterochromatin. *Exp Cell Res* *110*, 315-321.
- 276 - **St-Andre, O., Lemieux, C., Perreault, A., Lackner, D.H., Bahler, J., and Bachand, F.** (2010). Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(a)-binding protein in fission yeast. *J Biol Chem* *285*, 27859-27868.
- 277 - **Stoica, C., Carmichael, J.B., Parker, H., Pare, J., and Hobman, T.C.** (2006). Interactions between the RNA interference effector protein Ago1 and 14-3-3 proteins: consequences for cell cycle progression. *J Biol Chem* *281*, 37646-37651.
- 278 - **Stoilov, P., Rafalska, I., and Stamm, S.** (2002). YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends Biochem Sci* *27*, 495-497.
- 279 - **Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E., and Fitzgerald-Hayes, M.** (1995). A mutation in *CSE4*, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev* *9*, 573-586.
- 280 - **Strahl, B.D., and Allis, C.D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.
- 281 - **Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (1991). *Schizosaccharomyces pombe ste11+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* *5*, 1990-1999.
- 282 - **Sugiyama, A., Tanaka, K., Okazaki, K., Nojima, H., and Okayama, H.** (1994). A zinc finger protein controls the onset of premeiotic DNA synthesis of fission yeast in a Mei2-independent cascade. *EMBO J* *13*, 1881-1887.
- 283 - **Sugiyama, T., Cam, H., Verdell, A., Moazed, D., and Grewal, S.I.** (2005). RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 152-157.
- 284 - **Sugiyama, T., Cam, H.P., Sugiyama, R., Noma, K., Zofall, M., Kobayashi, R., and Grewal, S.I.** (2007). SHREC, an effector complex for heterochromatic transcriptional silencing. *Cell* *128*, 491-504.
- 285 - **Sugiyama, T., and Sugioka-Sugiyama, R.** (2011). Red1 promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetatively growing fission yeast. *EMBO J* *30*, 1027-1039.
- 286 - **Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., and Blelloch, R.** (2010). MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol* *20*, 271-277.
- 287 - **Suh, N., and Blelloch, R.** (2011). Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development* *138*, 1653-1661.

- 288 - **Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., and Gasser, S.M.** (2004). The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet* 38, 305-345.
- 289 - **Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., and Inoue, K.** (2009). DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. *PLoS One* 4, e7513.
- 290 - **Talbert, P.B., and Henikoff, S.** (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 264-275.
- 291 - **Tomari, Y., and Zamore, P.D.** (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.
- 292 - **Trewick, S.C., McLaughlin, P.J., and Allshire, R.C.** (2005). Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep* 6, 315-320.
- 293 - **Trewick, S.C., Minc, E., Antonelli, R., Urano, T., and Allshire, R.C.** (2007). The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin. *EMBO J* 26, 4670-4682.
- 294 - **Trojer, P., and Reinberg, D.** (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28, 1-13.
- 295 - **Tuzon, C.T., Borgstrom, B., Weilguny, D., Egel, R., Cooper, J.P., and Nielsen, O.** (2004). The fission yeast heterochromatin protein Rik1 is required for telomere clustering during meiosis. *J Cell Biol* 165, 759-765.
- 296 - **Valbuena, N., and Moreno, S.** (2010). TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. *PLoS One* 5, e11514.
- 297 - **Van Heeckeren, W.J., Dorris, D.R., and Struhl, K.** (1998). The mating-type proteins of fission yeast induce meiosis by directly activating *mei3* transcription. *Mol Cell Biol* 18, 7317-7326.
- 298 - **van Wolfswinkel, J.C., Claycomb, J.M., Batista, P.J., Mello, C.C., Berezikov, E., and Ketting, R.F.** (2009). CDE-1 affects chromosome segregation through uridylation of CSR-1-bound siRNAs. *Cell* 139, 135-148.
- 299 - **Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I., and Moazed, D.** (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676.
- 300 - **Verdel, A., and Moazed, D.** (2005). RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett* 579, 5872-5878.
- 301 - **Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M., and Touat-Todeschini, L.** (2009). Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol* 53, 245-257.
- 302 - **Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., and Martienssen, R.A.** (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.
- 303 - **Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., and Philippsen, P.** (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1065-1075.
- 304 - **Waddington, C.H.** (1942). The epigenotype. *Endeavour* 1, 18-20.
- 305 - **Wang, G., and Reinke, V.** (2008). A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol* 18, 861-867.
- 306 - **Wang, S.W., Stevenson, A.L., Kearsley, S.E., Watt, S., and Bahler, J.** (2008). Global role for polyadenylation-assisted nuclear RNA degradation in posttranscriptional gene silencing. *Mol Cell Biol* 28, 656-665.
- 307 - **Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Yoneki, T., Kakiyama, Y., Nabeshima, K., Kishi, Y.A., Shimoda, C., and Nojima, H.** (2001). Comprehensive isolation of meiosis-specific genes identifies novel proteins and unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 29, 2327-2337.
- 308 - **Watanabe, Y., Shinozaki-Yabana, S., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., and Yamamoto, M.** (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386, 187-190.

- 309 - **Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (1994). *S. pombe* mei2⁺ encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* 78, 487-498.
- 310 - **Watanabe, Y., and Yamamoto, M.** (1996). *Schizosaccharomyces pombe* pcr1⁺ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* 16, 704-711.
- 311 - **Wen, J., and Brogna, S.** (2010). Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 29, 1537-1551.
- 312 - **Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., and Bahler, J.** (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239-1243.
- 313 - **Wilkinson, C.R., Bartlett, R., Nurse, P., and Bird, A.P.** (1995). The fission yeast gene pmt1⁺ encodes a DNA methyltransferase homologue. *Nucleic Acids Res* 23, 203-210.
- 314 - **Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B., and Jones, N.** (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2289-2301.
- 315 - **Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- 316 - **Woolcock, K.J., Gaidatzis, D., Punga, T., and Buhler, M.** (2011). Dicer associates with chromatin to repress genome activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol* 18, 94-99.
- 317 - **Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- 318 - **Xu, F., Zhang, Q., Zhang, K., Xie, W., and Grunstein, M.** (2007). Sir2 deacetylates histone H3 lysine 56 to regulate telomeric heterochromatin structure in yeast. *Mol Cell* 27, 890-900.
- 319 - **Yamada, T., Fischle, W., Sugiyama, T., Allis, C.D., and Grewal, S.I.** (2005). The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast. *Mol Cell* 20, 173-185.
- 320 - **Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., and Watanabe, Y.** (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251-255.
- 321 - **Yamamoto, M.** (2010). The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis-meiosis switch in fission yeast. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 788-797.
- 322 - **Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., and Yamamoto, M.** (2010). Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J* 29, 2173-2181.
- 323 - **Yamashita, A., Watanabe, Y., Nukina, N., and Yamamoto, M.** (1998). RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Cell* 95, 115-123.
- 324 - **Yan, C., and Boyd, D.D.** (2006). Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Mol Cell Biol* 26, 6357-6371.
- 325 - **Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J.** (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 19, 405-419.
- 326 - **Zacher, B., Kuan, P.F., and Tresch, A.** (2010). Starr: Simple Tiling ARRay analysis of Affymetrix ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* 11, 194.
- 327 - **Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P., and Bradbury, E.M.** (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 277, 43474-43480.
- 328 - **Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E.** (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* 29, 6220-6231.
- 329 - **Zeng, W., Ball, A.R., Jr., and Yokomori, K.** (2010). HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics* 5, 287-292.

- 330 - **Zhang, K., Fischer, T., Porter, R.L., Dhakshnamoorthy, J., Zofall, M., Zhou, M., Veenstra, T., and Grewal, S.I.** (2011). Clr4/Suv39 and RNA quality control factors cooperate to trigger RNAi and suppress antisense RNA. *Science* 331, 1624-1627.
- 331 - **Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W., and Grewal, S.I.** (2008). Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 15, 381-388.
- 332 - **Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K.H., Hiller, M., de la Grange, P., Pudimat, R., Rafalska, I., Heinrich, B., Bujnicki, J.M., Allain, F.H., et al.** (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J Biol Chem* 285, 14701-14710.
- 333 - **Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.
- 334 - **Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W.** (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781-793.
- 335 - **Zofall, M., Fischer, T., Zhang, K., Zhou, M., Cui, B., Veenstra, T.D., and Grewal, S.I.** (2009). Histone H2A.Z cooperates with RNAi and heterochromatin factors to suppress antisense RNAs. *Nature* 461, 419-422.
- 336 - **Zofall, M., and Grewal, S.I.** (2006). Swi6/HP1 recruits a JmjC domain protein to facilitate transcription of heterochromatic repeats. *Mol Cell* 22, 681-692.

-Annexes-

Contrôle épigénétique de la différenciation cellulaire par le RNAi?



Aurelia Vasseur, Leila Todeschini, Edwige Hiriart, Benoit Gilquin, André Verdel



INSERM U823, Laboratoire d'ontogenèse et d'oncogenèse moléculaire, Equipe 13 avenir - interférence ARN et épigénétique, Institut Albert Bonniot, 38706 La Tronche Cedex, France

Introduction

L'interférence à l'ARN (RNAi) est un processus cellulaire **conservé de la levure à l'Homme**. Le RNAi inhibe l'expression génique avec une grande spécificité de séquence grâce à des petits ARN contenus dans des complexes effecteurs.

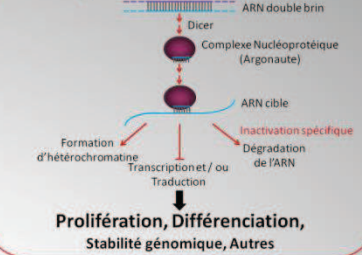
Le RNAi joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires, dont la régulation de la **différenciation** et de la prolifération cellulaires. De ce fait, une dérégulation du RNAi contribue au développement de maladies humaines telles que les **cancers**.

En parallèle, des stratégies thérapeutiques prometteuses basées sur l'utilisation du RNAi pour inhiber spécifiquement et à façon l'expression de gènes sont actuellement en développement ou en phase d'essais cliniques.

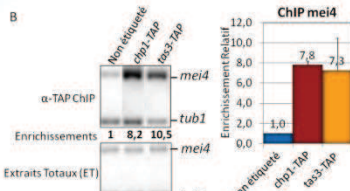
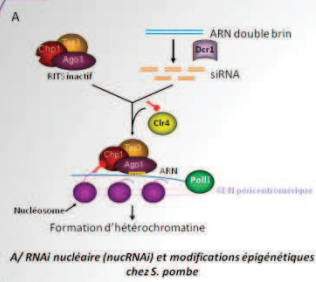
Problématique : Malgré d'importantes avancées ces dernières années, les mécanismes par lesquels le RNAi régule la différenciation chez les eucaryotes supérieurs restent en grande partie méconnus.

Nos travaux en cours s'effectuent chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, un organisme de référence pour l'étude des processus contrôlant le cycle et la différenciation cellulaires. chez la levure *S. pombe*, Ago1 et Dcr1 ont été démontrées comme étant importants pour la mise en place de la différenciation sexuelle. Cependant les mécanismes moléculaires mis en jeu par ces protéines du RNAi sont restés inexplorés.

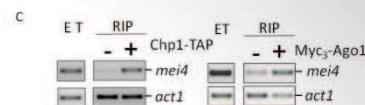
RNAi : un processus cytoplasmique ET nucléaire



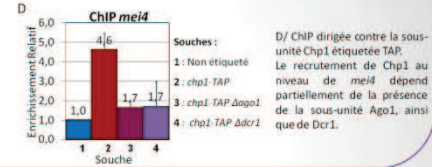
1 RITS cible des gènes codants impliqués dans la différenciation cellulaire de manière RNAi-dépendante.



B/ Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dirigée contre différentes sous-unités du complexe RITS étiquetées TAP. Les enrichissements sont calculés relativement au gène contrôle *tub1*. Le complexe RITS se localise spécifiquement au niveau de la chromatine du gène *mei4*, lors du cycle végétatif. *mei4* est un gène essentiel à la méiose.

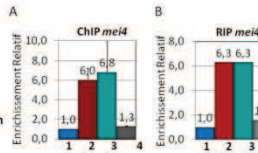
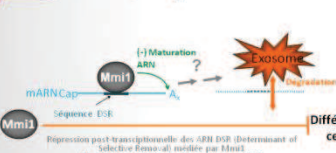


C/ Immunoprécipitation de l'ARN (RIP) dirigée contre différentes sous-unités du complexe RITS étiquetée TAP ou myc. Le complexe RITS se localise spécifiquement au niveau de l'ARN de *mei4*, lors du cycle végétatif.



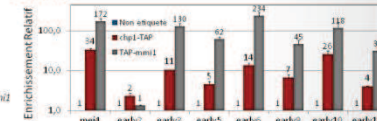
D/ ChIP dirigée contre la sous-unité Chp1 étiquetée TAP. Le recrutement de Chp1 au niveau de *mei4* dépend partiellement de la présence de la sous-unité Ago1, ainsi que de Dcr1.

2 Mmi1, une protéine liant l'ARN, est essentielle au recrutement de RITS sur des gènes codants.



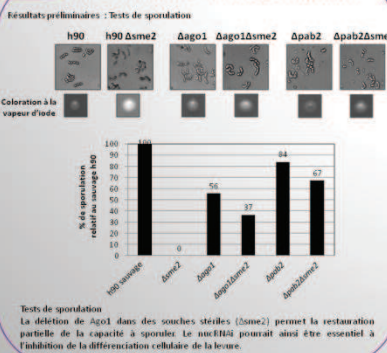
A/ ChIP et B/ RIP dirigées contre la sous-unité Chp1 étiquetée TAP. Le recrutement de Chp1 au niveau de la chromatine et de l'ARN de *mei4* dépend de Mmi1. Mmi1 est une protéine liant l'ARN, essentielle à l'inhibition de la différenciation cellulaire.

C/ Identification de nouveaux gènes cibles du RNAi par l'intermédiaire de Mmi1

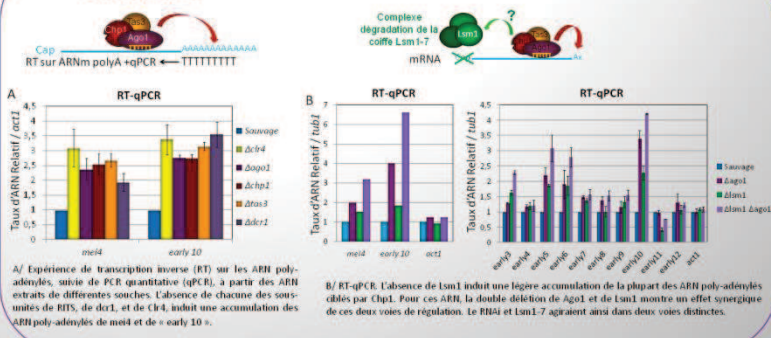


C/ RIP dirigées contre Chp1 et Mmi1 étiquetées TAP. Suite à une analyse différentielle à grande échelle des niveaux d'ARN dans une souche Δmml1 et une souche sauvage, nous avons identifié et validé une dizaine de gènes méiotiques dont les ARN sont cibles spécifiquement par Mmi1. Chp1 cible spécifiquement l'ARN de près d'une dizaine d'entre eux.

3 RITS et inhibition de la différenciation?



4 RITS pourrait faciliter la répression de gènes méiotiques en modulant la maturation de leurs ARNm.



Conclusion

L'ensemble de nos résultats suggère que RITS ciblerait spécifiquement près d'une dizaine de gènes de la différenciation cellulaire de *S. pombe* par l'intermédiaire de Mmi1 et d'ARNm en cours de synthèse.

L'effet du nucRNAi sur la régulation de gènes méiotiques pourrait avoir lieu au niveau post-transcriptionnel, et passerait par une modulation de la maturation des ARN cibles, plutôt que par la dégradation de ces ARN comme cela est le cas dans des régions non-codantes.

Ces résultats dévoilent l'existence d'un nouveau mode d'action du nucRNAi, inédit chez la levure. La répression exercée par le nucRNAi sur ces gènes méiotiques pourrait impliquer des mécanismes moléculaires similaires à ceux des miRNA chez les mammifères.

Perspectives

i) Par quels mécanismes précis RITS est-il recruté spécifiquement sur des gènes méiotiques ?

Nous chercherons à mieux définir de quelle manière la protéine Mmi1 participe à ce recrutement.

ii) Par quels mécanismes moléculaires RITS inactive-t-elle ses ARNm cibles ?

Nous déterminerons plus précisément les voies de maturation des ARN impliquées dans l'inactivation d'ARNm par le RNAi.

Poster présenté lors de la Journée ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) Jeunes Chercheurs, 2010, Paris.

The RNA binding protein Mmi1 connects RNAi to sexual differentiation control in fission yeast

Aurelia Vavasseur¹, Leila Todeschini¹, Edwige Hiriart¹, Benoit Gilquin¹, Emeline Lambert¹, Cyril Boyault¹, Jonathan Perot¹, Nicolas Nazaret², Joel Lachuer², Daniel Perazza¹ and André Verdel¹

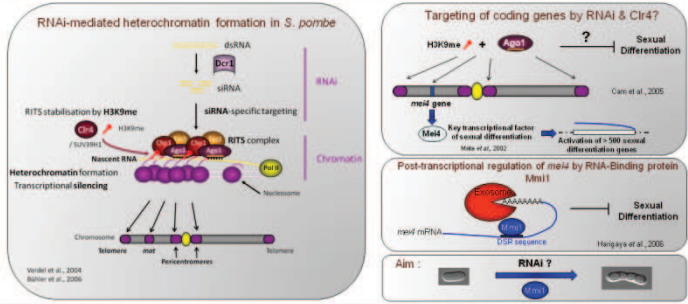
¹INSERM/UJF U823, Department of Cell Differentiation and Transformation Team 13 –RNA interference and Epigenetics, Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France
²ProfileXpert, Bron, France

Background and Aim of the study

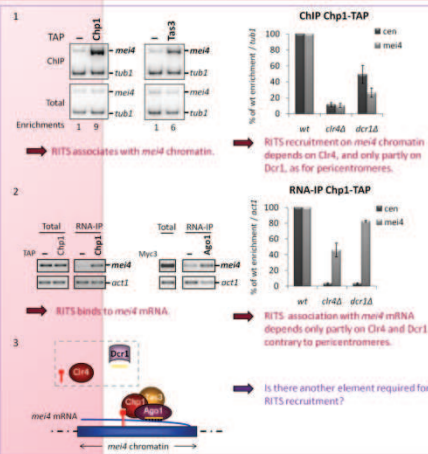
RNA interference (RNAi) is a cellular process known for inhibiting gene expression in a sequence-specific manner. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, this process induces modifications in chromatin structure and is assumed to involve an interaction between nascent transcripts and a small RNA contained in the RNAi complex. RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing). RITS targets repeated and non-coding regions, and is essential for heterochromatin initiation at these genomic sites.

In one study, RITS complex subunit Argonaute 1, and a heterochromatin mark, methylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9me), were detected on the chromatin of two meiotic genes, *mei4* and *ssm4*. This finding suggested a possible new function for RNAi in sexual differentiation.

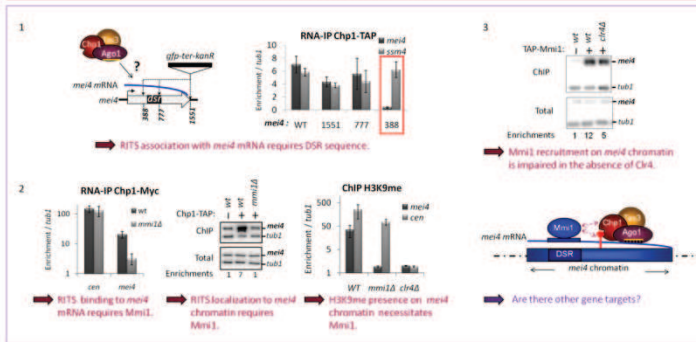
The aim of our study was to determine the mechanisms by which RNAi is recruited to specific sexual differentiation genes, and to study the biological significance of this recruitment.



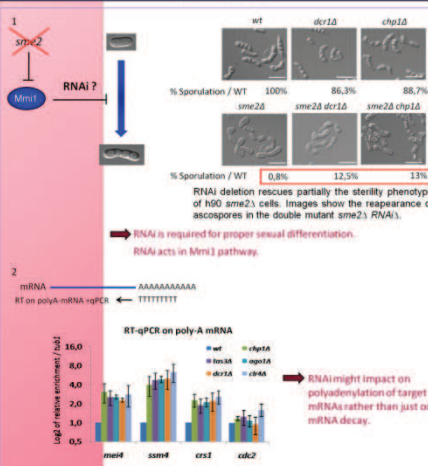
1- Conditional localization of RITS to *mei4* chromatin and mRNA



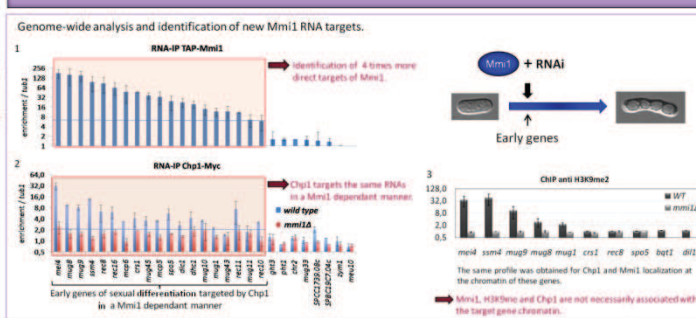
2- Mmi1 is required for RITS association to *mei4* mRNA as well as for RITS and H3K9me localization to *mei4* chromatin



4- RNAi participates in Mmi1-mediated function in sexual differentiation



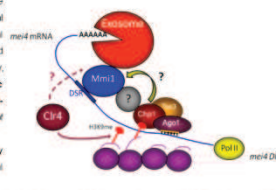
3- Mmi1 and Chp1 both associate to RNAs accumulating in « early » phase of sexual differentiation



Conclusions and Perspectives

We found that a RNA-binding protein, Mmi1, enables RITS to specifically associate with the chromatin and messenger RNAs of these meiotic genes. Mmi1 protein triggers a post-transcriptional repression of specific meiotic genes, a silencing activity essential for the control of sexual differentiation. We conducted a genome-wide transcriptomic analysis from a *mmi1Δ* strain, and uncovered additional meiotic mRNAs that are directly targeted by both Mmi1 and RNAi. Intriguingly, chromatin of the corresponding meiotic genes does not necessarily display the repressive epigenetic mark H3K9me, suggesting that RNAi might silence some protein-coding genes only at a post-transcriptional level. In parallel, we highlighted a potentially direct role for RNAi in the inhibition of sexual differentiation.

We propose that RNAi cooperates with Mmi1 to efficiently block expression of the early meiotic transcriptional programme during vegetative growth. This regulation might be essential for the proper timing of activation of this programme during sexual differentiation progression.



Contact: aurelia.vavasseur@e.ujf-grenoble.fr ; andre.verdel@ujf-grenoble.fr

Poster présenté lors du congrès international « Gordon Research Conference on Epigenetics », 2011, Easton, USA.

La protéine de liaison à l'ARN Mmi1 connecte le RNAi au contrôle de la différenciation sexuelle chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Aurélia Vavas seur¹, Leila Todeschini¹, Edwige Hiriart¹, Benoit Gilquin¹, Emeline Lambert¹, Cyril Boyault¹, Jonathan Perot¹, Nicolas Nazaret², Joël Lachuer², Daniel Perazza¹ et André Verdel¹

¹INSERM/UJF U823, Département de Différenciation Cellulaire et Transformation, Equipe 13 – Interférence à l'ARN et Epigénétique, Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France
²ProfilExpert, Bron, France

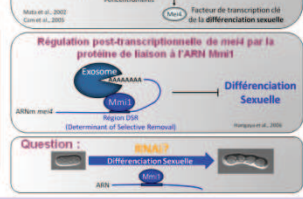
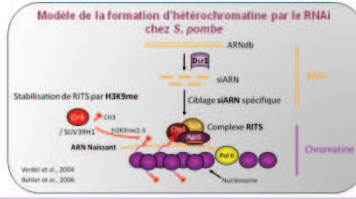
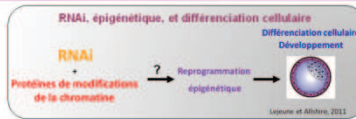
Introduction et Objectifs

L'interférence à l'ARN (RNAi) est un mécanisme cellulaire conservé de la levure à l'Homme, connu pour inhiber l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel avec une grande spécificité de séquence. Un nombre croissant de travaux révèle que le RNAi peut également exercer sa régulation en induisant des modifications épigénétiques de la chromatine.

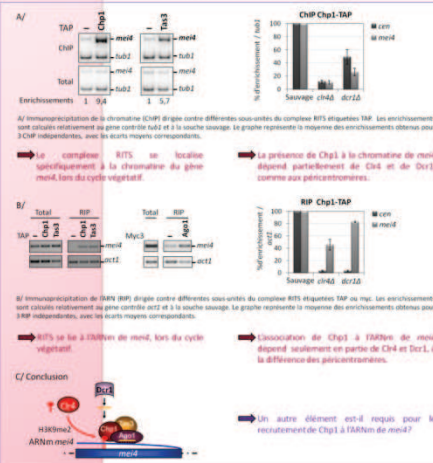
Le RNAi joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires, dont la régulation du développement, de la différenciation et de la prolifération. De ce fait, une dérégulation du RNAi contribue au développement de maladies humaines telles que les cancers.

Problématique : Malgré d'importantes avancées ces dernières années, les mécanismes épigénétiques par lesquels le RNAi régule la différenciation chez les eucaryotes supérieurs restent en grande partie méconnus.

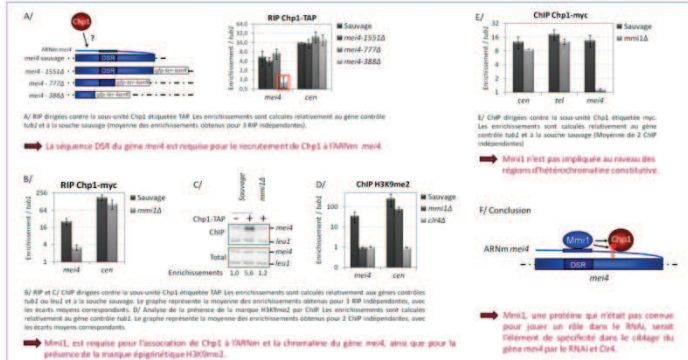
Nos travaux en cours s'effectuent chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, un organisme de référence pour l'étude des processus contrôlant le cycle et la différenciation cellulaires. Chez cette levure, le RNAi cible les régions répétées et non codantes et joue un rôle essentiel dans l'intégrité de l'hétérochromatine de ces sites génomiques. Une étude a mis en évidence la présence de la protéine clé du RNAi Argonaute 1, ainsi que d'une marque épigénétique, la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2), au niveau de la chromatine de deux gènes méiotiques, *mei4* et *cenH*. Ceci suggérerait une nouvelle fonction du RNAi dans la différenciation sexuelle. Le but de notre étude a été de déterminer les mécanismes par lesquels le RNAi est recruté au niveau de gènes de la différenciation, et d'étudier le rôle biologique de ce recrutement.



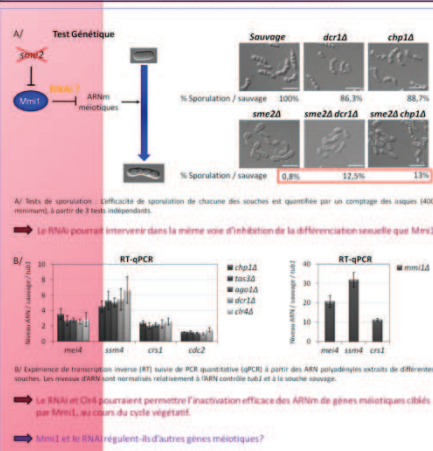
1- Localisation conditionnelle de RITS à la chromatine et à l'ARNm de *mei4*.



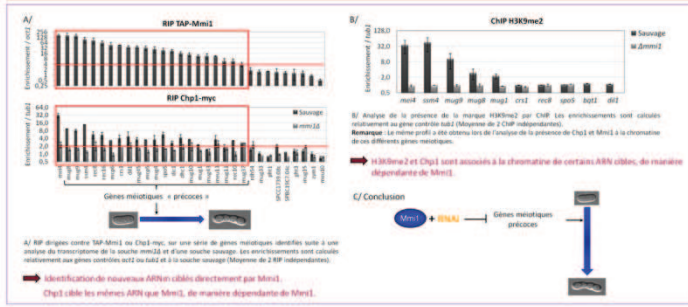
2- Mmi1 est requise pour l'association de Chp1 à l'ARNm de *mei4* ainsi que pour la présence de Chp1 et H3K9me2 à la chromatine de *mei4*.



3- Le RNAi contribue à l'inhibition de la différenciation sexuelle mise en place par Mmi1.



4- Le RNAi participe au contrôle des phases précoces de la différenciation sexuelle en ciblant les ARNm régulés par Mmi1.



Conclusions et Perspectives

L'ensemble de nos résultats suggère que le complexe RITS ciblerait spécifiquement près d'une vingtaine de gènes de phases précoces de la différenciation cellulaire de *S. pombe* par l'intermédiaire de la protéine de liaison à l'ARN Mmi1 et d'ARNm en cours de synthèse. Dans certains cas, ce ciblage induit des modifications épigénétiques de la chromatine.

Nous proposons que le RNAi et l'histone méthyltransférase Ctr4 pourraient coopérer avec Mmi1 pour bloquer de manière efficace une partie du programme transcriptionnel méiotique durant le cycle végétatif. Cette régulation serait essentielle pour l'activation appropriée de ce programme au cours de la progression de la différenciation sexuelle.

La protéine Mmi1, et lient entre le RNAi, l'épigénétique et la régulation de la différenciation apparaissent conservés au cours de l'évolution des eucaryotes. Nos travaux pourraient alors aider des études visant à comprendre ces mécanismes chez les eucaryotes supérieurs, ainsi que l'implication de défauts de ce mode de régulation dans des pathologies humaines de différenciation cellulaire telles que les cancers, mais aussi pour la mise au point de thérapies ciblées.

Contacts: aurelia.vavas seur@e.ujf-grenoble.fr ; andre.verdel@ujf-grenoble.fr

-Abstract-

RNA interference (RNAi) is a cellular process known for inhibiting gene expression in a sequence-specific manner. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, this process induces modifications in chromatin structure and is assumed to involve an interaction between nascent transcripts and a small RNA contained in the RNAi complex, RITS (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing). **RITS** targets repeated and non-coding regions, and is essential for **heterochromatin** integrity at these genomic sites.

In one study, RITS complex subunit Argonaute 1, and a heterochromatin mark, methylation of histone H3 on lysine 9 (**H3K9me**), were detected on the chromatin of two **meiotic genes**, *mei4* and *ssm4*. This finding suggested a possible new function for RNAi in sexual differentiation. During my PhD studies, I found that a RNA-binding protein, **Mmi1** (Meiotic mRNA interception protein 1), enables RITS to specifically associate with the chromatin and messenger RNAs of these meiotic genes. Mmi1 protein triggers a post-transcriptional repression of specific meiotic genes, a **silencing** activity essential for the control of sexual differentiation. We conducted a genome wide transcriptomic analysis from a *mimi1Δ* strain, and uncovered additional meiotic mRNAs that are directly targeted by both Mmi1 and RNAi. Intriguingly, chromatin of the corresponding meiotic genes does not necessarily display the repressive **epigenetic** mark H3K9me, suggesting that RNAi might silence some protein-coding genes only at a **post-transcriptional** level. In parallel, combining genetic, molecular biology and physiological techniques, we highlighted a potentially direct role for RNAi in the inhibition of sexual differentiation.

We propose **that RNAi cooperates with Mmi1 to efficiently block expression of the early meiotic transcriptional programme during vegetative growth**. This regulation might be essential for the **proper timing of activation** of this programme during sexual differentiation progression.

-Résumé-

L'interférence à l'ARN (RNAi) est un mécanisme cellulaire connu pour inhiber l'expression de gènes avec une grande spécificité de séquence. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, ce processus induit des modifications de structure de la chromatine et implique une interaction entre un ARN naissant et un petit ARN associé au complexe du RNAi, **RITS** (RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing). RITS cible les régions répétées et non codantes et joue un rôle essentiel dans l'intégrité de l'**hétérochromatine** de ces sites génomiques.

Une étude a mis en évidence la présence de la sous-unité Argonaute 1 du complexe RITS, ainsi qu'une marque de l'hétérochromatine, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (**H3K9me**), au niveau de la chromatine de deux **gènes méiotiques**, *mei4* et *ssm4*. Ceci suggérait une nouvelle fonction du RNAi dans la **différenciation sexuelle**. Au cours de ma thèse, j'ai montré que la protéine de liaison à l'ARN **Mmi1** (Meiotic mRNA interception protein 1), permet à RITS de s'associer spécifiquement à la chromatine et à l'ARN messenger de ces gènes méiotiques. La protéine Mmi1 orchestre une répression post-transcriptionnelle de gènes méiotiques spécifiques, une activité de « **silencing** » essentielle au contrôle de la différenciation sexuelle. Nous avons mené une analyse de l'ensemble du transcriptome dans une souche déficiente pour Mmi1, ce qui nous a conduits à l'identification de nouveaux ARNm méiotiques ciblés directement par Mmi1 et le RNAi. Curieusement, la chromatine des gènes méiotiques correspondants ne présente pas systématiquement la marque **épigénétique** répressive H3K9me, ce qui suggère que le RNAi pourrait réprimer certains gènes codants seulement au niveau **post-transcriptionnel**. En parallèle, en combinant des techniques de génétique, de biologie moléculaire et de physiologie cellulaire, nous mettons en évidence un probable rôle direct du RNAi dans l'inhibition de la différenciation sexuelle.

Nous proposons que **le RNAi pourrait coopérer avec Mmi1 pour bloquer de manière efficace une partie du programme transcriptionnel méiotique durant le cycle végétatif**. Cette régulation serait essentielle pour l'**activation appropriée** de ce programme au cours de la progression de la différenciation sexuelle.