

# L'interférence par l'ARN et la formation d'hétérochromatine chez *Schizosaccharomyces pombe*

Sophie Barral<sup>1,2</sup>, Aurélie Vavasseur<sup>1,2</sup> et André Verdel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U823, Institut Albert Bonniot

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier, F-38700 Grenoble, France

Auteur correspondant : André Verdel, [andre.verdel@ujf-grenoble.fr](mailto:andre.verdel@ujf-grenoble.fr)

Reçu le 31 mars 2007

**Résumé** – Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'assemblage d'hétérochromatine péricentromérique implique l'interférence par l'ARN (iARN). Des données récentes indiquent que deux complexes de l'iARN, RITS (« RNA-induced transcriptional silencing complex ») et RDRC (« RNA-directed RNA polymerase complex »), leur activité enzymatique respective, ainsi que l'ARN polymérase II sont au cœur du processus de formation d'hétérochromatine guidé par l'iARN. Au niveau de la région à « hétérochromatiser », l'ARN polymérase II synthétise un ARN, qui servirait de plate-forme pour recruter RITS et RDRC à la chromatine, et initier la formation d'hétérochromatine. Une fois recrutés, RITS et RDRC semblent également participer activement à la dégradation de l'ARN plate-forme. Ainsi, l'assemblage d'hétérochromatine guidé par l'iARN mettrait en jeu en *cis* un processus dynamique de synthèse d'ARN, de recrutement ARN-dépendant de complexes de l'iARN, et de dégradation d'ARN.

**Mots clés** : RITS / hétérochromatine / interférence par l'ARN (iARN) / RDRC / *Schizosaccharomyces pombe* / extinction transcriptionnelle

**Abstract** – RNAi and the formation of heterochromatin in *Schizosaccharomyces pombe*.

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, formation of pericentromeric heterochromatin involves RNA interference (RNAi). Recent data indicate that two RNAi complexes, RITS (RNA-induced transcriptional silencing complex) and RDRC (RNA-directed RNA polymerase complex), their respective enzymatic activity, and RNA polymerase II are essential for RNAi-mediated heterochromatin formation. At the site where heterochromatin formation takes place, RNA polymerase II synthesizes an RNA that would serve as an RNA platform to recruit in a siRNA-dependent manner RITS and RDRC, and thereby initiate heterochromatin assembly. Once recruited, RITS and RDRC seem to also contribute to the processing of the RNA platform. Therefore, RNAi-driven heterochromatin assembly appears to take place through a dynamic process of RNA synthesis, RNA-dependent recruitment of RNAi complexes and RNA degradation that all occur in *cis*.

**Key words**: RITS / heterochromatin / RNA interference (RNAi) / RDRC / *Schizosaccharomyces pombe* / transcriptional silencing.

---

## L'interférence par l'ARN : aspects généraux.

En 1998, les groupes de Fire et Mello ont découvert que l'introduction d'ARN double brin (ARNdb) dans le ver *Caenorhabditis elegans* induit une extinction

(*silencing*) puissante et séquence-spécifique de l'expression génique (Fire *et al.*, 1998). Le processus responsable de cette réduction au silence de l'expression d'un gène, nommé interférence par l'ARN, a depuis été mis en évidence dans la quasi-totalité des organismes eucaryotes étudiés, avec l'exception notable de

la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De manière importante, l'iARN n'est pas juste un processus activé par l'introduction d'ARNdb exogène au sein de la cellule. L'iARN est en fait une voie cellulaire naturelle qui participe à la régulation d'évènements multiples comme la différenciation, l'apoptose, la réponse à un stress thermique ou encore la lutte contre des infections virales (Bartel, 2004; Croce & Calin, 2005).

Les mécanismes mis en jeu par l'iARN pour réguler ces évènements ont pour la plupart été observés dans le cytoplasme, mais l'iARN exerce également des fonctions essentielles au sein du noyau. Ainsi, il est apparu que l'inhibition de la mobilité de rétrotransposons et de la recombinaison homologue entre séquences répétées, la ségrégation des chromosomes et l'organisation spatiale du génome mettent en jeu l'iARN chez divers eucaryotes (Horn & Peterson, 2006; Martienssen *et al.*, 2005; Matzke & Birchler, 2005; Verdel & Moazed, 2005; Wassenegger, 2005).

Sur un plan mécanistique, l'iARN peut bloquer l'expression génique aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'iARN est déclenchée par la présence d'ARNdb au sein de la cellule. L'enzyme Dicer, une ribonucléase de type III, clive l'ARNdb en de petits ARNs d'une vingtaine de nucléotides. L'ARNdb pris en charge par la ribonucléase Dicer peut être formé soit par l'association de deux molécules d'ARN complémentaires soit par un seul ARN qui, comme une épingle à cheveux, se replie sur lui-même. Le produit de la réaction catalysée par Dicer est appelé ARNsi (*small interfering*) ou ARNmi (micro), selon qu'il est issu du clivage, respectivement, de deux molécules d'ARN ou d'une seule. Les ARNsi proviennent d'ARNdb produit à partir d'une région donnée du génome ainsi que de virus au cours d'une infection de la cellule. Les ARNmi sont quant à eux issus d'unités de transcription présentes dans le génome qui produisent l'ARN en épingle à cheveux. Cet ARN subit une première maturation dans le noyau avant d'être exporté dans le cytoplasme sous la forme d'un ARN d'environ 70 nucléotides replié sur lui-même.

Dans le cytoplasme, les deux types de petits ARNs, ARNsi et ARNmi, contribuent à la régulation post-transcriptionnelle guidée par le processus de l'iARN. Les ARNsi et ARNmi prennent place dans des complexes effecteurs de l'iARN de type RISC (« RNA-Induced Silencing Complex »). Au sein de RISC, ces ARNs forment grâce à leur séquence nucléotidique un module de reconnaissance qui permet un ciblage sélectif de l'ARNm à inactiver. L'association de RISC à sa cible ARN entraîne alors un blocage de l'expression protéique dont le mécanisme varie selon qu'il s'agisse d'un ARNsi ou d'un ARNmi. Généralement, les ARNsi engendrent la dégradation de l'ARNm cible, tandis que les ARNmi induisent un blocage de la traduction.

Chez certains eucaryotes, l'iARN met également en jeu des polymérases qui grâce à leur activité RDR (*RNA-directed RNA polymerase*) produisent de l'ARNdb à partir d'une matrice ARN simple brin. L'activité RDR de ces polymérases permettrait d'augmenter le nombre d'ARNsi et de complexes effecteurs de l'iARN reconnaissant un même ARN cible, et aboutirait de cette façon à accroître l'efficacité de la réponse de l'iARN.

## Les fonctions nucléaires de l'iARN.

L'iARN est impliquée dans divers mécanismes qui modifient les propriétés structurales et fonctionnelles de la chromatine (Matzke & Birchler, 2005; Wassenegger, 2005). Chez les plantes, la méthylation ARN-dépendante induite par la présence d'ARN viroïde, de même que d'autres processus associés à la méthylation de l'ADN génomique et/ou à la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), sont sous le contrôle direct de l'iARN (Brodersen & Voinnet, 2006; Wassenegger, 2005). Des travaux plus récents suggèrent que cette implication de l'iARN dans la méthylation de l'ADN et de H3K9 serait conservée dans de nombreux eucaryotes dont les mammifères (Morris, 2005; Deshpande *et al.*, 2005; Fukagawa *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Pal-Bhadra *et al.*, 2004; Yang & Kazazian, 2006; Morris, 2005). Chez des protozoaires ciliés, l'iARN participe au remodelage séquence-spécifique et extrême de la chromatine, puisqu'il aboutit à l'élimination de près de 15% du génome du noyau somatique (le macro noyau), lors de la maturation de ce dernier après la conjugaison (Mochizuki *et al.*, 2002; Nowacki *et al.*, 2005). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, l'iARN est nécessaire à la formation d'hétérochromatine péricentromérique dont la présence est essentielle à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire.

Les travaux réalisés chez *S.pombe* au cours de ces quatre dernières années ont permis plusieurs avancées déterminantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par l'iARN pour former de l'hétérochromatine (Horn & Peterson, 2006; Martienssen *et al.*, 2005; Verdel & Moazed, 2005). Par ailleurs, l'implication de l'iARN dans la formation d'hétérochromatine péricentromérique serait également conservée chez la drosophile et les vertébrés (Almeida & Allshire, 2005; Matzke & Birchler, 2005; Morris, 2006; Wassenegger, 2005; Fukagawa *et al.*, 2004; Kanellopoulou *et al.*, 2005; Yang & Kazazian, 2006; Deshpande *et al.*, 2005). Il est donc probable que les mécanismes découverts chez *S.pombe* sont au moins partiellement conservés au cours de l'évolution.

Chez *S.pombe*, l'hétérochromatine est principalement concentrée au niveau des centromères, des

télomères et de la région du déterminisme sexuel (Grewal, 2000). Cette structure particulière de la chromatine est généralement retrouvée dans des régions pauvres en gènes, elle a la particularité de réduire au silence la transcription, et elle joue un rôle essentiel dans la stabilité du génome. Des structures de type hétérochromatine permettent également la répression à long terme de l'expression de gènes impliqués dans le développement de l'organisme. Avant la découverte du rôle de l'iARN dans l'assemblage d'hétérochromatine il était connu qu'une orchestration de modifications post-traductionnelles des histones et de recrutements de protéines sur ces mêmes histones se produit au cours de la mise en place d'hétérochromatine (Grewal & Moazed, 2003). Ainsi, la formation d'hétérochromatine passerait par la désacétylation des histones, suivie de la méthylation spécifique de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me) et du recrutement de protéines à chromodomaine dont Swi6 (un membre de la famille des protéines HP1) et Chp1 (Chromodomain protein) qui se lient via leur chromodomaine au résidu modifié H3K9me (Grewal & Moazed, 2003).

La levure *S.pombe* possède une copie unique des gènes codant pour des protéines clés de la voie de l'iARN : Dicer 1 (Dcr1), la ribonucléase de type III qui clive les longs ARNdb en ARNsi, Argonaute 1 (Ago1), qui appartient à la famille de protéines du même nom, et Rdp1, une ARN polymérase capable de produire de l'ARNdb à partir d'un ARN matrice (Verdel & Moazed, 2005). Les travaux des groupes de Martienssen et Grewal ont les premiers révélé que dans des souches de levure dépourvues d'iARN (cellules  $\Delta dcr1$ ,  $\Delta ago1$  ou  $\Delta rdp1$ ), l'extinction transcriptionnelle et la formation d'hétérochromatine des régions centromériques sont rapidement perdues (Volpe *et al.*, 2002). Ils ont également mis en évidence que les brins sens et anti-sens de l'ADN des régions péri-centromériques sont transcrits et que la protéine Rdp1 est associée à ces régions d'hétérochromatine. Par ailleurs, dans le même temps, le clonage de petits ARNs présent chez *S.pombe* a mis en évidence l'existence d'ARNsi provenant de ces mêmes régions (Reinhart & Bartel, 2002). Dans leur ensemble, ces résultats ont suggéré un modèle où l'iARN serait activée par la production d'ARNdb par l'intermédiaire de la transcription des deux brins de l'ADN péri-centromérique et/ou de l'activité RDR de Rdp1 (Volpe *et al.*, 2002). L'ARNdb clivé par Dcr1 produit des ARNsi qui, par un mécanisme alors inconnu, permettraient le recrutement à la chromatine de la protéine Rdp1, ainsi que la formation ou le maintien de l'hétérochromatine. L'étude de l'assemblage d'hétérochromatine au niveau de la région du déterminisme sexuel a complété ces données en indiquant que l'iARN est nécessaire à l'étape d'initiation

de la formation d'hétérochromatine au niveau de cette région (Hall *et al.*, 2002).

Ce chapitre présente une revue des travaux réalisés chez *S.pombe* pour comprendre le rôle de l'iARN dans la formation d'hétérochromatine, en mettant en avant tout particulièrement les avancées permises par la purification de deux nouveaux complexes de l'iARN, RITS et RDRC. Ces travaux ont porté principalement sur les mécanismes d'assemblage de l'hétérochromatine péri-centromérique et confortent un modèle où cet assemblage serait initié après le recrutement de RITS et RDRC sur un ARN en cours de polymérisation par l'ARN polymérase II. Ce mécanisme semble, d'une part, généralisable à l'ensemble des sites majeurs d'hétérochromatine chez *S.pombe* et, d'autre part, pourrait être conservé chez de nombreux eucaryotes.

### **RITS, un complexe ribonucléoprotéique à la croisée des processus de l'iARN et de l'assemblage d'hétérochromatine.**

Indépendamment des travaux qui ont impliqué l'iARN dans la formation d'hétérochromatine, des études sur les protéines HP1 (*Heterochromatin Protein*), des protéines à chromodomaine et homologues à Swi6, avaient également évoqué un rôle de l'ARN dans l'assemblage d'hétérochromatine. En effet, une analyse *in situ* de la localisation des protéines HP1, dans des cellules perméabilisées et traitées ou non à la RNase A, avait suggéré que leur recrutement à l'hétérochromatine centromérique mettait en jeu une interaction avec de l'ARN (Maison *et al.*, 2002). D'autre part, des expériences *in vitro* avaient montré que ces mêmes protéines interagissent avec l'ARN et que leur chromodomaine ainsi qu'une séquence adjacente riche en acides aminés chargés positivement sont directement impliqués dans cette interaction (Murchardt *et al.*, 2002). Ces données associées à celles impliquant l'iARN dans la formation d'hétérochromatine ont motivé une approche basée sur la purification de protéines à chromodomaine et de protéines de l'iARN pour définir le rôle de l'ARN dans l'assemblage d'hétérochromatine.

La protéine à chromodomaine Chp1 de *S.pombe* était connue pour être essentielle à la formation d'hétérochromatine et pour agir à une étape précoce de ce processus (Doe *et al.*, 1998; Partridge *et al.*, 2002; Thon & Verhein-Hansen, 2000). La purification de la protéine Chp1 a permis, à elle seule, une avancée déterminante, puisqu'elle a conduit à l'identification d'un complexe nommé RITS (*RNA-Induced Transcriptional gene Silencing complex*), où résident à la fois une protéine centrale de l'assemblage d'hétérochromatine (Chp1) et une protéine au cœur

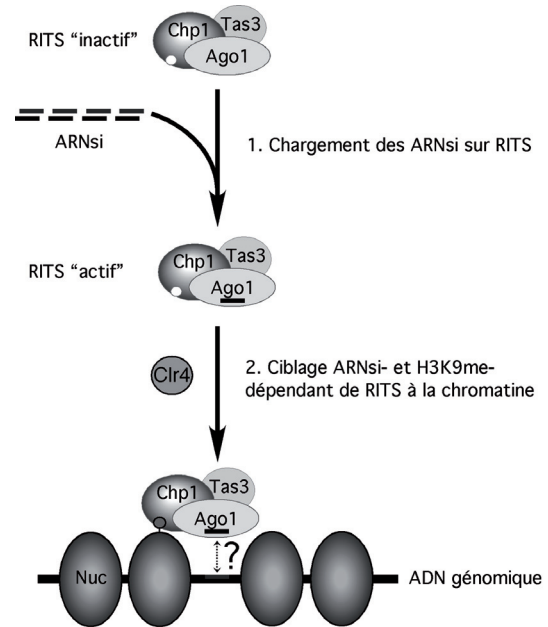
de l'iARN (Ago1) (Verdel *et al.*, 2004). Cette purification a validé, dans le même temps, les données génétiques qui avaient suggéré un rôle direct de l'iARN dans la formation d'hétérochromatine (Volpe *et al.*, 2002, 2003).

Le complexe RITS contient en plus de Chp1 et Ago1 une troisième protéine nommée Tas3 (*Targeting subunit*) (Fig. 1) et dont la fonction et l'importance dans la formation d'hétérochromatine n'étaient jusqu'alors pas connues. La caractérisation de Tas3 a montré qu'elle est essentielle au recrutement de Chp1 à la chromatine péricentromérique, et par conséquent à l'extinction transcriptionnelle et à la formation d'hétérochromatine centromérique (Verdel *et al.*, 2004). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (*Chromatin Immunoprecipitation* ou ChIP) ont montré que Tas3 a le même profil de localisation à l'hétérochromatine que Chp1 et Ago1, ce qui a conduit à proposer que le complexe RITS s'associe spécifiquement aux régions d'hétérochromatine (Verdel *et al.*, 2004).

La protéine Ago1 appartient à la famille Argonaute, dont plusieurs membres avaient été identifiés au sein de complexes de type RISC. Ces complexes partagent tous la particularité de contenir également des ARNsi (ou ARNmi). La détection d'éventuels acides nucléiques associés à RITS a montré qu'il contient lui aussi de petits ARNs d'environ 22 nucléotides (Verdel *et al.*, 2004). Le fait que, dans une souche déficiente pour *dcr1*, RITS ne contienne plus d'ARNsi a été une première indication que ces ARNs seraient des ARNsi (Verdel *et al.*, 2004). Dans une étude préalable, la caractérisation par clonage et séquençage des ARNs d'une vingtaine de nucléotides présents chez *S.pombe* avait permis l'identification de 12 ARNsi qui proviennent tous d'ADN répétés présent dans les régions péricentromériques. Afin de déterminer si ces ARNsi sont présents dans RITS, douze oligonucléotides complémentaires de ces ARNsi ont été radiomarqués et utilisés comme sonde dans une expérience de « Northern blot ». Cette expérience a démontré que RITS est bien un complexe ribonucléoprotéique qui contient des ARNsi (Verdel *et al.*, 2004).

### Recrutement ARNsi-dépendant de RITS à la chromatine (Fig. 1).

En l'absence de Dicer (*Dcr1*), la voie de l'iARN ne produit plus d'ARNsi et la formation d'hétérochromatine centromérique est bloquée (Volpe *et al.*, 2003; Volpe *et al.*, 2002). Ce résultat, bien qu'en faveur d'une implication des ARNsi dans la formation d'hétérochromatine, ne précisait toutefois pas le rôle exact des ARNsi dans ce processus. La pu-



**Fig. 1. Recrutement ARNsi-dépendant du complexe RITS à la chromatine.** Le complexe RITS peut se former en l'absence d'ARNsi. Lorsqu'un ARNsi est chargé dans RITS ce complexe peut alors interagir avec la région de chromatine qui possède la séquence complémentaire à l'ARNsi (le mécanisme par lequel l'ARNsi permettrait à RITS d'interagir avec la chromatine est décrit dans le texte et présenté plus en détail dans la Figure 3). L'association de RITS à la chromatine serait stabilisée par l'histone méthyltransférase Clr4 qui méthyle spécifiquement le résidu H3-K9. En l'absence de cette méthylation RITS ne peut pas induire la formation d'hétérochromatine. Le mode de recrutement initial de Clr4 au niveau de cette même région reste à ce jour inconnu. Nuc : nucléosome ; petit rond sur le deuxième nucléosome. Lysine 9 méthylée de l'histone H3 (H3K9me).

rification de RITS a été un point de départ dans la « dissection » des mécanismes mis en jeu pour assembler de l'hétérochromatine. En effet, la purification de RITS à partir d'une souche  $\Delta dcr1$  a montré que le complexe se forme toujours en absence d'ARNsi, excluant ainsi la possibilité d'un rôle clé des ARNsi dans l'architecture du complexe RITS (Verdel *et al.*, 2004). En revanche, dans la souche  $\Delta dcr1$ , RITS ne s'associe plus à la chromatine. Des expériences de « Southern Blot », où les ARNsi associés à RITS ont été isolés et utilisés comme sondes, ont révélé que ces ARNsi s'hybrident spécifiquement à l'ADN de régions d'hétérochromatine mais pas à de l'ADN d'une région d'euchromatine. D'après ces données, il a été proposé que l'ARNsi associé à un complexe RITS pourrait constituer un module de reconnaissance qui, par l'intermédiaire de sa séquence nucléotidique, cible la région génomique où doit se for-

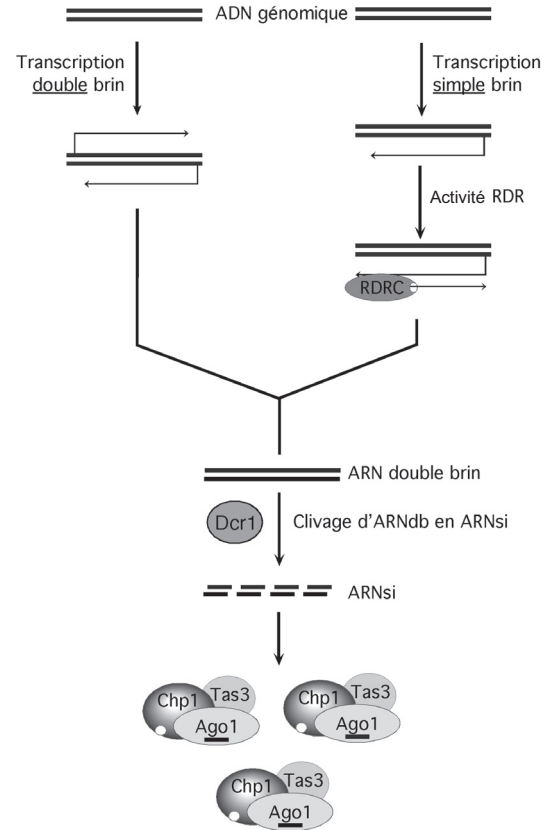


mer de l'hétérochromatine (Verdel *et al.*, 2004; Verdel & Moazed, 2005). Par la suite, d'autres expériences ont mis en évidence que RITS est capable d'induire la formation d'hétérochromatine *in trans* lorsqu'une région du génome contient la même séquence nucléotidique que celle présente au premier foyer de formation de l'hétérochromatine (Buhler *et al.*, 2006). Cet effet *in trans* est un argument fort en faveur d'une implication majeure de l'ARNsi dans la reconnaissance de la cible génomique par le complexe RITS. Toutefois, il est important de noter que la formation d'hétérochromatine *in trans* n'a été observée que dans une souche qui n'exprime plus la nucléase Eri1 (Buhler *et al.*, 2006). Cette nucléase, qui semble avoir un rôle de régulateur négatif en dégradant les ARNsi, pourrait agir en limitant le nombre de RITS chargés en ARNsi dirigés contre une même région ce qui pourrait être un moyen de contrôler l'assemblage d'hétérochromatine *in trans*.

## Synthèse d'ARN double brin et formation d'hétérochromatine (Fig. 2).

En parallèle aux travaux menés sur Chp1, la purification de Rdp1 a également dévoilé plusieurs aspects importants de la formation d'hétérochromatine contrôlée par l'iARN. Rdp1 est une protéine qui présente une forte homologie de séquences avec des polymérases présentes chez *Neurospora crassa*, *Caenorhabditis elegans* et les plantes. Ces polymérases étaient connues pour occuper une place importante dans la voie de l'iARN. Chez les plantes, ce type de polymérase s'était également avéré nécessaire à la méthylation de l'ADN guidée par l'iARN. Chez *S.pombe*, la protéine Rdp1 comme d'autres protéines de l'iARN était essentielle à la formation d'hétérochromatine (Hall *et al.*, 2002; Verdel *et al.*, 2004; Volpe *et al.*, 2002). En revanche, Rdp1 était la seule protéine de l'iARN connue pour avoir une localisation spécifique au niveau de régions d'hétérochromatine (Volpe *et al.*, 2002). Ce dernier résultat, en faveur d'une implication directe de Rdp1 dans l'assemblage d'hétérochromatine, a motivé la purification de Rdp1 afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine et plus globalement de l'iARN dans la formation d'hétérochromatine.

La purification de Rdp1 a permis l'identification d'un nouveau complexe de l'iARN appelé RDRC (*RNA-Directed RNA polymerase Complex*) (Motamedi *et al.*, 2004). Le complexe RDRC est formé de trois sous-unités : Cid12, une protéine appartenant à une famille de poly(A)-polymérase atypique, Hrr1, une probable hélicase d'ARN et Rdp1, une hypothétique ARN polymérase. De manière intéressante, tout comme pour Rdp1, des protéines homologues à Hrr1 et Cid12 ont aussi été impliquées dans la



**Fig. 2. Les voies de synthèse de l'ARNdb impliquées dans la formation d'hétérochromatine.** Deux voies de synthèse de l'ARNdb semblent impliquées dans l'activation de l'iARN et la production subséquente d'ARNsi retrouvés dans RITS. La première voie mettrait en jeu la transcription des deux brins d'ADN d'une même région du génome. Cette voie permettrait la production d'une première population d'ARNsi. Cette population d'ARNsi ne serait pas suffisante pour la formation d'hétérochromatine. En revanche, elle serait nécessaire au recrutement de RDRC à un ARN matrice qui proviendrait de la région à « hétérochromatiser ». L'association de RDRC à cet ARN se ferait par l'intermédiaire de son interaction avec RITS qui ciblerait cet ARN grâce à l'ARNsi produit par la transcription double brin (voir texte et Figure 3 pour plus de détails). Une fois recruté, RDRC permettrait la production d'une deuxième population d'ARNsi. Cette population secondaire d'ARNsi aboutirait au chargement de nombreux complexes RITS avec des ARNsi provenant de la même région du génome.

voie de l'iARN par des criblages génétiques chez *Arabidopsis thaliana* et *C.elegans*. L'identité des sous-unités de RDRC a de plus indiqué que ce complexe est doté potentiellement de deux activités de polymérisation catalysées respectivement par Rdp1 et Cid12. Des expériences *in vitro* ont confirmé que RDRC a bien une activité de synthèse d'ARNdb à

partir d'un ARN matrice (activité RDR) et qui est catalysée par Rdp1 (Motamedi *et al.*, 2004). En revanche, l'activité poly(A) de Cid12 n'a, à ce jour, pas encore été démontrée.

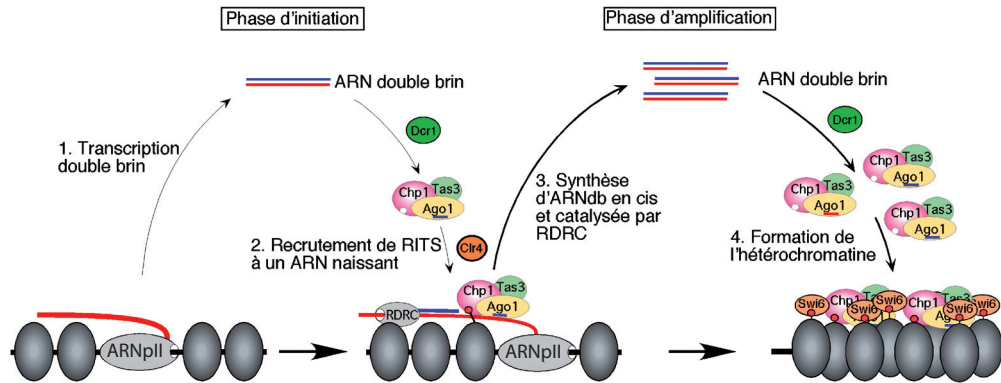
De la même manière que pour *rdp1*, l'élimination du gène *hrr1* ou *cid12* entraîne la perte d'hétérochromatine péricentromérique (Motamedi *et al.*, 2004). De ce fait, le complexe RDRC s'est avéré être le deuxième complexe de l'ARN essentiel à la formation d'hétérochromatine. Afin de déterminer plus précisément si l'activité RDR de Rdp1 joue un rôle déterminant dans cette formation d'hétérochromatine, une analyse de mutants de Rdp1 a été conduite. Des tests *in vitro* d'activité RDR ont montré que, lorsque la protéine Rdp1 est tronquée de ses 50 derniers acides aminés ou plus subtilement lorsqu'elle est mutée sur un seul acide aminé localisé dans son site catalytique, le complexe RDRC n'a plus d'activité RDR (Motamedi *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2005). En parallèle, des expériences *in vivo* ont montré que les souches qui expriment ces mêmes mutants de Rdp1 ne forment plus d'hétérochromatine péricentromérique. Des expériences d'immunoprécipitation d'ARN ou RIP (*RNA immunoprecipitation*) ont complété ces travaux en montrant que RDRC s'associe sélectivement à l'ARN provenant de l'hétérochromatine péricentromérique mais pas d'une région d'euchromatine comme l'actine (Motamedi *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données a ainsi indiqué que le complexe RDRC a bien une activité RDR, dont la fonction serait de produire de l'ARNdb correspondant spécifiquement aux régions à « hétérochromatiser ».

Les premiers travaux des groupes de Martienssen et Grewal avaient évoqué la possibilité que la transcription des brins sens et anti-sens d'une même région d'ADN génomique représenterait une voie de production de l'ARNdb correspondant à la région à « hétérochromatiser » (Volpe *et al.*, 2002). Les travaux de purification et de caractérisation du complexe RDRC ont quant à eux mis en évidence une voie alternative de la synthèse d'ARNdb (Motamedi *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2005). La possibilité d'avoir deux voies de synthèse de l'ARNdb au cours de la formation d'hétérochromatine a conduit à déterminer le rôle de chacune de ces deux voies. Une première analyse a montré que, dans des souches déficientes pour l'une des sous-unités de RDRC ( $\Delta rdp1$ ,  $\Delta hrr1$  ou  $\Delta cid12$ ), le complexe RITS ne contient plus ou quasiment plus d'ARNsi (Motamedi *et al.*, 2004). Cette analyse a ainsi mis en exergue la place prépondérante de RDRC dans la production des ARNsi associés à RITS et a, du même coup, suggéré que la deuxième voie aurait au mieux une contribution mineure dans la production de ces ARNsi. Néanmoins, une deuxième analyse a mis en évidence

que l'interaction de RDRC avec l'ARN centromérique, et donc la synthèse d'ARNdb catalysée par RDRC, requiert Dcr1 (Motamedi *et al.*, 2004). Si le recrutement de RDRC à son ARN matrice nécessite la production préalable d'ARNsi, alors des ARNsi doivent être produits indépendamment de la voie RDRC. La transcription des brins sens et antisens pourrait donc tout de même être une voie essentielle à la formation d'hétérochromatine, même si elle ne semble pas importante pour la production massive d'ARNsi. Dans ce cas, cette transcription produirait en amont de la voie RDRC une première population d'ARNsi qui serait nécessaire au recrutement du complexe RDRC à l'ARN pour qu'il produise dans un deuxième temps une population bien plus importante d'ARNsi. Cette deuxième vague d'ARNsi permettrait alors de charger un grand nombre de complexes RITS en ARNsi provenant d'une même région d'ADN, une étape essentielle à la formation d'hétérochromatine.

### Recrutement de RITS à la chromatine par l'intermédiaire d'un ARN naissant.

La caractérisation initiale de RITS avait indiqué que les ARNsi et leur séquence nucléotidique jouent un rôle central dans le recrutement de ce dernier à la chromatine. En revanche, les mécanismes par lesquels les ARNsi participent au recrutement de RITS à la chromatine restaient à préciser. Deux mécanismes possibles étaient évoqués pour ce recrutement. Dans le premier cas, l'ARNsi associé à RITS s'hybriderait directement à un des deux brins de l'ADN de la région à « hétérochromatiser ». Dans le deuxième cas, il s'hybriderait à un ARN en cours de polymérisation dans cette même région. Des analyses par spectrométrie de masse des purifications de RDRC et des expériences de co-immunoprécipitation ont fourni une première indication précieuse en faveur du second mécanisme en révélant que le complexe RITS interagit avec RDRC et de ce fait que RITS, tout comme RDRC, pourrait interagir avec de l'ARN (Motamedi *et al.*, 2004). Des expériences de RIP ont démontré *in vivo* que RITS s'associe effectivement à de l'ARN. Par ailleurs, ces expériences ont révélé que RITS se lie à l'ARN avec la même spécificité d'interaction que RDRC, et donc que ces deux complexes se colocaliseraient sur de l'ARN. En parallèle, des expériences d'immunofluorescence ont révélé que les complexes RITS et RDRC se co-localisent uniquement au niveau des foyers d'hétérochromatine. Cette double colocalisation de RITS et RDRC, d'une part sur de l'ARN et d'autre part au niveau de l'hétérochromatine, a fourni une deuxième indication en faveur d'un recrutement de RITS à la chromatine via son interaction avec un ARN. D'autres expériences de RIP ont montré que



**Fig. 3. Modèle de l'initiation de la formation d'hétérochromatine guidée par RITS.** Au cours d'une phase d'initiation, la transcription des deux brins d'ADN d'une région du génome produirait des ARNs qui permettraient à RITS d'être recruté sur cette région. RITS s'associerait à cette région par l'intermédiaire de son ARNs qui s'hybriderait avec la séquence complémentaire d'un ARN en cours de polymérisation. Grâce à son interaction avec RDRC, le recrutement de RITS serait accompagné de celui de RDRC. Une fois associé à l'ARN naissant, RDRC synthétiserait un ARN complémentaire et produirait ainsi de l'ARNdb. La production *in cis* d'ARNdb conduirait à amplifier la production d'ARNs et de cette manière à obtenir un nombre suffisant de complexes RITS chargés en ARNs correspondant à une même région pour induire la formation d'hétérochromatine. ARNpII : ARN polymérase II.

Clr4 (l'histone méthyltransférase responsable de la méthylation de H3K9) est essentielle à l'interaction de RITS à l'ARN (Motamedi *et al.*, 2004). Dans leur ensemble ces résultats ont étayé le modèle selon lequel RITS et RDRC seraient recrutés à la chromatine par l'intermédiaire d'un ARN naissant. Par ailleurs, ces dernières expériences de RIP ont mis en avant le fait que le contexte chromatinien (la présence ou non de H3K9me) peut influencer l'interaction de RITS à l'ARN.

Plusieurs travaux ont par la suite conforté la vraisemblance du modèle de l'ARN naissant. Notamment, des criblages génétiques mis en place pour identifier de nouveaux acteurs de la formation d'hétérochromatine ont révélé que l'ARN polymérase II est essentielle à la formation d'hétérochromatine aux centromères (Djupedal *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2005). L'analyse d'un mutant de l'ARN polymérase II a montré que ce n'est pas le recrutement de la polymérase à la chromatine qui serait déterminant mais bien la transcription de l'ADN, ce qui est en accord avec le modèle de l'ARN naissant (Djupedal *et al.*, 2005). Plus récemment, Buhler *et al.* (2006) ont développé un système artificiel qui a permis de tester directement le modèle de l'ARN naissant. L'objectif de ce système était de recruter RITS sur un ARNm transcrit par l'ARN polymérase II afin de déterminer si RITS peut de cette manière être recruté à la chromatine de ce gène. La stratégie choisie a été de fusionner à la sous-unité Tas3 de RITS le domaine protéique ( $\Delta N$ ), qui se lie très spécifiquement au motif ribonucléotidique (appelé site BoxB), et en parallèle d'intégrer des sites BoxB en aval de la séquence codante du gène *ura4*. L'analyse par des expériences de CHIP a montré que,

lorsque le gène *ura4-BoxB* est transcrit, ce système permet à RITS d'être recruté à la chromatine de ce gène (Fig. 3). Par ailleurs, ce recrutement est accompagné au niveau du gène en question d'une extinction transcriptionnelle, de la méthylation de H3K9 et du recrutement de la protéine Swi6, trois éléments reflétant la formation d'hétérochromatine. Ce système a ainsi démontré que le mécanisme mis en jeu dans le modèle de l'ARN naissant a bien la capacité de recruter le complexe RITS à la chromatine et de permettre la formation d'hétérochromatine. Cependant, il est à noter qu'à ce jour aucune donnée n'exclut la possibilité que le recrutement de RITS à la chromatine passe également par une interaction directe avec de l'ADN génomique.

L'existence d'un mécanisme où RDRC est recruté vers la région à « hétérochromatiser » implique que la synthèse d'ARNdb catalysée par RDRC se fasse *in cis* (sur le site de formation de l'hétérochromatine). Deux autres études ont récemment mis en évidence que RITS, par l'intermédiaire d'Ago1, est doté d'une activité nucléolytique (activité « slicer » ou éminceuse) qui clive l'ARN cible après hybridation de l'ARNs à l'ARN complémentaire (Buker *et al.*, 2007; Irvine *et al.*, 2006). Cette activité enzymatique est nécessaire à l'assemblage d'hétérochromatine aux centromères. De ce fait, il est possible que l'activité éminceuse (*slicer*) contribue à la dégradation *in cis* de l'ARN plate-forme. Jusqu'à présent, il était admis que l'extinction transcriptionnelle qui accompagne l'assemblage d'hétérochromatine était due à une forte diminution de l'accessibilité à l'ADN, rendant ainsi sa transcription impossible. La mise en évidence d'un mécanisme de dégradation co-transcriptionnel suggère

que l'extinction transcriptionnelle imposée par la présence d'hétérochromatine pourrait être en partie le résultat d'un mécanisme dynamique, où l'ARN en cours de polymérisation serait rapidement dégradé par une machinerie impliquant l'iARN.

### Implication de l'iARN dans d'autres sites de formation de l'hétérochromatine.

Des portions de l'ADN répété présent dans l'hétérochromatine péricentromérique se retrouvent dans les deux autres sites majeurs de formation d'hétérochromatine que sont les télomères et la région du déterminisme sexuel. Or, ces sites produisent aussi des ARNsi retrouvés dans RITS (Cam *et al.*, 2005). Ces données ont ainsi indiqué que l'iARN pourrait contribuer à former de l'hétérochromatine ailleurs qu'aux centromères. Des travaux menés sur la région du déterminisme sexuel ont indiqué que l'iARN y joue un rôle important dans l'étape d'initiation de la formation d'hétérochromatine (Hall *et al.*, 2002). Cependant, une deuxième voie dépendante de facteurs de transcription de la famille ATF/CREB participe également à la formation de l'hétérochromatine (Jia *et al.*, 2004). La signification de cette redondance (s'il en existe une) n'est actuellement pas connue. De la même manière, la formation d'hétérochromatine subtélomérique semble impliquer à la fois une voie iARN-dépendante et une voie iARN-indépendante (Hansen *et al.*, 2006; Kanoh *et al.*, 2005; Petrie *et al.*, 2005). En revanche, dans ce cas, il a été observé qu'en l'absence d'iARN, les télomères ne s'apparient plus au cours de la méiose, malgré l'assemblage d'hétérochromatine assuré par la voie iARN-indépendante (Hall *et al.*, 2003). Ces résultats ont mis en évidence que le rôle de l'iARN au sein du noyau pourrait ne pas se limiter pas à la formation d'hétérochromatine puisqu'il participerait également à l'organisation spatiale du génome. De manière intéressante, ce rôle de l'iARN a depuis été mis en évidence chez la drosophile dans le contexte de l'insulateur Gypsy et des régions soumises à une extinction transcriptionnelle imposée par les protéines Polycomb (Grimaud *et al.*, 2006; Lei & Corces, 2006). L'implication de l'iARN dans l'organisation spatiale de la chromatine ne se limiterait donc pas à *S.pombe*, mais pourrait bien être conservée dans d'autres eucaryotes.

Récemment, des composants du complexe RITS ont également été localisés dans d'autres régions du génome de *S.pombe* dont des régions intergéniques sans fonction connue, les gènes qui codent pour les ARN ribosomiques ainsi que des gènes essentiels à la mise en place de la méiose (un processus de différenciation cellulaire à part entière) (Cam

*et al.*, 2005; données non publiées du laboratoire). Les mécanismes de recrutement de RITS et le rôle de l'iARN au niveau de ces régions du génome n'est pas établi. Toutefois, il est tentant de penser que, dans le cas des gènes méiotiques, le recrutement de RITS et/ou d'autres complexes de l'iARN régulerait l'expression de ces gènes et pourrait ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de la différenciation cellulaire. Ainsi, de la même manière que pour l'implication de l'iARN dans l'organisation spatiale du noyau, l'existence d'un tel mécanisme impliquerait que la fonction biologique de RITS ne se limiterait pas à la formation d'hétérochromatine constitutive. Ces autres fonctions de RITS et plus globalement de l'iARN restent à être explorées.

### Conclusion.

La purification chez *S.pombe* de deux complexes de l'iARN, RITS et RDRC, et leur caractérisation par des expériences *in vitro* et *in vivo* qui exploitent la puissance de la génétique moléculaire de la levure ont rapidement permis des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes mis en jeu par l'iARN pour former de l'hétérochromatine. Ces données représentent (avec celles obtenues chez les plantes) la meilleure description des mécanismes impliquant l'iARN dans la modification de la structure et de la fonction de la chromatine. Ces deux complexes de l'iARN et leur activité respective de clivage de l'ARN cible et de synthèse d'ARNdb sont nécessaires pour la formation d'hétérochromatine et l'extinction transcriptionnelle qui s'en suit. Le recrutement de RITS et RDRC à la chromatine semble se faire selon le modèle de l'ARN naissant qui met en jeu une interaction séquence-spécifique entre un ARNsi contenu dans RITS et un ARN en cours de polymérisation. Les données disponibles principalement chez les plantes mais également chez *Tetrahymena*, *N.crassa*, *C.elegans*, la drosophile et les vertébrés sont en faveur d'une conservation au cours de l'évolution de la capacité de l'iARN à modifier la chromatine. Au delà des travaux nécessaires pour tester l'universalité de cette propriété de l'iARN, de nombreuses questions majeures restent en suspens. Quand et comment les histones désacétylases et l'histone méthyltransférase Clr4 qui doivent agir avant ou pendant l'association de RITS à la chromatine sont-elles recrutées aux histones? Plus généralement, quel est le lien physique entre RITS et les différentes activités de modifications de la chromatine requises pour la formation d'hétérochromatine? Quel est le rôle biologique des régulateurs négatifs de l'iARN dans la formation d'hétérochromatine? Quelles sont les autres fonctions biologiques et les mécanismes impliquant l'iARN au



sein du noyau ? Nul doute que les travaux en cours et à venir, chez *S.pombe* et d'autres eucaryotes, devraient continuer à nous apporter d'importantes avancées sur le rôle de l'iARN et, plus généralement, de l'ARN dans la dynamique de l'organisation de la chromatine.

## Remerciements

Nous souhaitons remercier S., Fritah, F., Hans, et E.C., Ibrahim, pour leurs lectures avisées du manuscrit et leurs discussions constructives. Les travaux rapportés sur la caractérisation des complexes RITS et RDRC ont été réalisés pour la majeure partie dans le laboratoire de Danesh Moazed. Les études que nous menons au laboratoire sur cette thématique sont soutenues financièrement par l'INSERM et l'Association pour la Recherche contre le Cancer (Subvention « Equipe en émergence »).

## Références

- Almeida, R. & Allshire, R.C. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol*, 2005, 15, 251-258.
- Bartel, D.P. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116, 281-297.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, 2006, 22, 268-280.
- Buhler, M., Verdel, A. & Moazed, D. Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. *Cell*, 2006, 125, 873-886.
- Buker, S.M., Iida, T., Buhler, M., Villen, J., Gygi, S.P., Nakayama, J. & Moazed, D. Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14, 200-207.
- Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C. & Grewal, S.I. Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet*, 2005, 37, 809-819.
- Croce, C.M. & Calin, G.A. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 2005, 122, 6-7.
- Deshpande, G., Calhoun, G. & Schedl, P. Drosophila argonaute-2 is required early in embryogenesis for the assembly of centric/centromeric heterochromatin, nuclear division, nuclear migration, and germ-cell formation. *Genes Dev*, 2005, 19, 1680-1685.
- Djupedal, I., Portoso, M., Spahr, H., Bonilla, C., Gustafsson, C.M., Allshire, R.C. & Ekwall, K. RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev*, 2005, 19, 2301-2306.
- Doe, C.L., Wang, G., Chow, C., Fricker, M.D., Singh, P.B. & Mellor, E.J. The fission yeast chromo domain encoding gene *chp1(+)* is required for chromosome segregation and shows a genetic interaction with  $\alpha$ -tubulin. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26, 4222-4229.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391, 806-811.
- Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T. & Oshimura, M. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*, 2004, 6, 784-791.
- Grewal, S.I. Transcriptional silencing in fission yeast. *J Cell Physiol*, 2000, 184, 311-318.
- Grewal, S.I. & Moazed, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 2003, 301, 798-802.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U. & Cavalli, G. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell*, 2006, 124, 957-971.
- Hall, I.M., Noma, K. & Grewal, S.I. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, 193-198.
- Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. & Grewal, S.I. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, 2002, 297, 2232-2237.
- Hansen, K.R., Ibarra, P.T. & Thon, G. Evolutionarily conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34, 78-88.
- Horn, P.J. & Peterson, C.L. Heterochromatin assembly : a new twist on an old model. *Chromosome Res*, 2006, 14, 83-94.
- Irvine, D.V., Zaratiegui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L. & Martienssen, R.A. Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science*, 2006, 313, 1134-1137.
- Janowski, B.A., Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D. & Corey, D.R. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13, 787-792.
- Jia, S., Noma, K. & Grewal, S.I. RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science*, 2004, 304, 1971-1976.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M. & Rajewsky, K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 2005, 19, 489-501.
- Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T. & Ishikawa, F. Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin

- independently of RNAi at telomeres. *Curr Biol*, 2005, 15, 1808-1819.
- Kato, H., Goto, D.B., Martienssen, R.A., Urano, T., Furukawa, K. & Murakami, Y. RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science*, 2005, 309, 467-469.
- Kim, D.H., Villeneuve, L.M., Morris, K.V. & Rossi, J.J. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13, 793-797.
- Lei, E.P. & Corces, V.G. RNA interference machinery influences the nuclear organization of a chromatin insulator. *Nat Genet*, 2006, 38, 936-941.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., Quivy, J.P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T. & Almouzni, G. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet*, 2002, 30, 329-334.
- Martienssen, R.A., Zaratiegui, M. & Goto, D.B. RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet*, 2005, 21, 450-456.
- Matzke, M.A. & Birchler, J.A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, 2005, 6, 24-35.
- Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. & Gorovsky, M.A. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, 2002, 110, 689-699.
- Morris, K.V. siRNA-mediated transcriptional gene silencing : the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62, 3057-3066.
- Morris, K.V. Therapeutic potential of siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biotechniques*, 2006, *Suppl*, 7-13.
- Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P. & Moazed, D. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell*, 2004, 119, 789-802.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A. & Yaniv, M. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep*, 2002, 3, 975-981.
- Nowacki, M., Zagorski-Ostojka, W. & Meyer, E. Nowa1p and Nowa2p : novel putative RNA binding proteins involved in trans-nuclear crosstalk in *Paramecium tetraurelia*. *Curr Biol*, 2005, 15, 1616-1628.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. & Elgin, S.C. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, 2004, 303, 669-672.
- Partridge, J.F., Scott, K.S., Bannister, A.J., Kouzarides, T. & Allshire, R.C. cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol*, 2002, 12, 1652-1660.
- Petrie, V.J., Wuitschick, J.D., Givens, C.D., Kosinski, A.M. & Partridge, J.F. RNA interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 chromodomain protein with distinct heterochromatic loci in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 2005, 25, 2331-2346.
- Reinhart, B.J. & Bartel, D.P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 2002, 297, 1831.
- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. & Grewal, S.I. 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*, 2005, 102, 152-157.
- Thon, G. & Verhein-Hansen, J. Four chromo-domain proteins of *Schizosaccharomyces pombe* differentially repress transcription at various chromosomal locations. *Genetics*, 2000, 155, 551-568.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. & Moazed, D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303, 672-676.
- Verdel, A. & Moazed, D. RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett*, 2005, 579, 5872-5878.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. & Martienssen, R.A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 2002, 297, 1833-1837.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A. & Allshire, R.C. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*, 2003, 11, 137-146.
- Wassenegger, M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell*, 2005, 122, 13-16.
- Yang, N. & Kazazian, H.H., Jr. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13, 763-771.