

Le rôle des piARNs dans la spermatogenèse murine

Angélique Girard et Gregory J. Hannon

Watson School of Biological Sciences Cold Spring Harbor Laboratory 1 Bungtown road Cold Spring Harbor, NY 11724 USA

Auteur correspondant : Angélique Girard, girard@cshl.edu

Reçu le 27 Août 2007

Résumé – La famille des Argonautes, les partenaires directs des petits ARNs dans les mécanismes d'interférence par l'ARN, se divise en deux sous-groupes : les Argonautes et les Piwis. Chez les animaux, le sous-groupe des Argonautes se lie aux petits ARNs interférents (siARNs) et aux microARNs (miARNs) qui mesurent 21-22 nucléotides et sont responsables du clivage et de l'inhibition traductionnelle des ARNs cibles respectivement. Les protéines Piwis ont pour partenaires de petits ARNs de 24-30 nucléotides appelés *Piwi-interacting RNAs* ou piARNs. Chez la drosophile, les protéines Piwi et les piARNs protègent le génome de la lignée germinale contre les éléments mobiles. Des analyses récentes suggèrent que cette fonction est conservée chez les mammifères.

Mots clés : ARNi / Piwi / piRNAs / lignée germinale / transposons

Abstract – The role of piRNAs in mouse spermatogenesis.

The Argonaute proteins, which are the direct partners of the small RNAs involved in RNA interference mechanisms, can be divided into two subfamilies, the Argonautes and the Piwis. In animals, the Argonaute subfamily binds 21-22 nucleotide small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs), which direct cleavage and translational inhibition of their target RNAs respectively. The partners of the Piwi proteins are 24-30-nucleotide small RNAs called Piwi-interacting RNAs or piRNAs. In *Drosophila*, Piwi proteins and piRNAs protect the genome of the germline against selfish elements. Recent studies suggest that this function is conserved in mammals.

Introduction

L'interférence par l'ARN (ARNi) est un mécanisme de régulation des gènes, que l'on retrouve chez la plupart des eucaryotes (Hannon, 2002). Il repose sur la reconnaissance et la répression d'ARNs cibles par de petits ARNs complémentaires d'environ 25 nucléotides. L'ARNi est généralement considérée comme un système ancestral de défense contre les parasites, qui a peu à peu évolué pour assurer des rôles divers dans la répression de gènes endogènes et exogènes à l'organisme. A chacun de ces rôles correspond une classe de petits ARNs.

Ainsi, de nombreux organismes (plantes, nématodes, drosophiles) continuent d'utiliser l'ARNi comme mécanisme de défense contre les parasites exogènes, par le biais de petits ARNs interférents (*small-interfering RNAs* ou siARNs) de

21-22 nucléotides (Cullen, 2006). L'appariement des siARNs à des cibles parfaitement complémentaires provoque le clivage et la dégradation de celles-ci.

Les microARNs (miARNs) régulent les gènes de la cellule au niveau posttranscriptionnel. Chez les animaux, les miARNs peuvent reconnaître des cibles partiellement complémentaires et réprimer leur traduction en protéines (Ambros, 2004). Ce mode flexible de régulation génique permet aux miARNs de contrôler les processus les plus dynamiques de l'organisme, tels que le cycle et la différenciation cellulaires.

Enfin, de même que leur cousins exogènes, les gènes parasites ou transposons sont la cible de petits ARNs appelés *repeat-associated siRNAs* ou rasiARNs. Les rasiARNs, généralement plus longs que les siARNs et les miARNs (21-27 nucléotides), sont impliqués dans la répression transcriptionnelle des éléments transposables (*transcriptional gene silencing*

ou TGS) (Lippman & Martienssen, 2004). Ils reconnaissent les transcrits naissants des transposons et recrutent des ADN méthyltransférases et des histone méthyltransférases qui induisent la formation d'hétérochromatine sur les séquences d'ADN correspondantes. De tels mécanismes de TGS ont été décrits chez les plantes, les ciliés et la levure *S. pombe*.

Les protéines Argonautes sont au cœur du complexe effecteur des mécanismes d'ARNi (Carmell *et al.*, 2002). La famille des Argonautes est définie par la présence de deux domaines, PAZ et PIWI, dont les fonctions respectives ont été révélées par leur analyse cristallographique (Song & Joshua-Tor, 2006). Le domaine PAZ interagit avec l'extrémité 3' des petits ARNs, tandis que le domaine PIWI forme un site catalytique de type RNase H qui est la source de l'activité enzymatique de clivage des ARNs cibles.

Les protéines Argonautes des animaux se divisent en deux sous-familles, les Agos et les Piwis. Les Agos, au nombre de quatre chez les mammifères (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4), sont les partenaires des siARNs et des miARNs et participent au clivage et à la répression traductionnelle des ARNs cibles. Chez les plantes et la levure, la sous-famille des Agos est également responsable de la répression transcriptionnelle des transposons (Lippman & Martienssen, 2004). De manière similaire, la transfection d'un siARN dans une lignée cellulaire humaine peut déclencher, en partenariat avec AGO1 ou AGO2, la formation d'hétérochromatine (Janowski *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Cependant, ni l'une ni l'autre de ces protéines n'a été impliquée dans un mécanisme naturel de TGS (Morita *et al.*, 2007). En accord avec leur expression ubiquitaire et leur rôle dans la régulation des gènes par les miARNs, les phénotypes des mutants Ago sont souvent pléiotropiques et sévères.

Les protéines Piwi sont en revanche spécifiques à la lignée germinale (Sasaki *et al.*, 2003). Pendant longtemps, les Piwis sont restés les parents pauvres de la famille des Argonautes. Alors que les Agos étaient de mieux en mieux caractérisés à la fois sur les plans biochimique et génétique, l'absence de modèle *in vitro* pour les gènes Piwi a rendu leur analyse difficile. Récemment, de nombreuses publications ont éclairé d'un jour nouveau le rôle des Piwis dans le développement de la lignée germinale murine.

Des protéines Argonautes spécifiques à la lignée germinale

Il y a trois gènes Piwi communs à l'homme et à la souris : Hiwi/Miwi (*Piwi-like* 1), Hili/Mili (*Piwi-like* 2) et Hiwi2/Miwi2 (*Piwi-like* 4). Les souris mâles homozygotes nulles pour n'importe lequel de ces trois gènes sont stériles (Carmell *et al.*, 2007,

Deng & Lin, 2002, Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). Curieusement, bien que Mili ait été détecté par RT-PCR dans les ovaires des nouveau-nés femelles (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001), aucun phénotype n'a été observé chez les femelles mutantes. Chez le mâle, les mutations des trois gènes ont des effets différents sur la spermatogenèse.

Celle-ci est grossièrement divisée en trois phases. Lors de la spermatocytogenèse, les spermatogonies, des cellules peu différenciées qui comptent dans leurs rangs une petite sous-population de cellules souches, se divisent mitotiquement pour donner naissance aux cellules méiotiques, les spermatocytes. Ces derniers entrent en méiose, composée de deux divisions, à l'issue desquelles les spermatocytes deviennent des spermatides rondes. Au cours de la dernière phase, la spermiogenèse, les spermatides rondes s'allongent progressivement et se transforment en spermatozoïdes.

Chez les mutants *miwi*, la spermatogenèse s'arrête au stade des spermatides rondes précoces (Deng & Lin, 2002). Les mutants *mili* et *miwi2* ont un phénotype plus sévère, caractérisé à la fois par une disparition progressive des spermatogonies et par un arrêt méiotique complet en milieu de prophase I (Carmell *et al.*, 2007; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). De façon frappante, chez les trois mutants, on observe une mort cellulaire massive tout au long du processus de spermatogenèse.

La spécificité à la lignée germinale est un trait commun à toute la sous-famille des Piwis. Des homologues sont présents dans les génomes de nombreux animaux, des cnidiens aux vertébrés. Dans tous les cas testés, les gènes Piwi sont exprimés presque exclusivement dans la lignée germinale et les animaux porteurs de mutations sont stériles.

D. melanogaster possède trois gènes : Piwi, Aubergine (Aub) et Ago3. Les mutants mâles et femelles *piwi* et *aub* sont stériles et présentent, comme chez la souris, des phénotypes à la fois préméiotiques, méiotiques et postméiotiques. Chez les deux sexes, Piwi est essentiel à la maintenance des cellules souches germinales (Cox *et al.*, 2000, Lin & Spradling, 1997). A la différence des gènes murins, Piwi est exprimé à la fois dans les cellules souches et la niche et joue un rôle autonome et non-autonome dans la prolifération et le renouvellement des cellules souches. Chez les mutants *aub* mâles, la protéine codée par les séquences répétées Stellate est surexprimée et forme des cristaux toxiques à l'intérieur des spermatocytes (Schmidt *et al.*, 1999). La progéniture des femelles mutantes *aub* meurt à l'état embryonnaire à cause d'un défaut de polarisation (Schupbach & Wieschaus, 1991). Chez *C. elegans*, les deux gènes Prg-1 et Prg-2 sont également nécessaires au renouvellement des cellules souches germinales (Cox *et al.*, 1998).

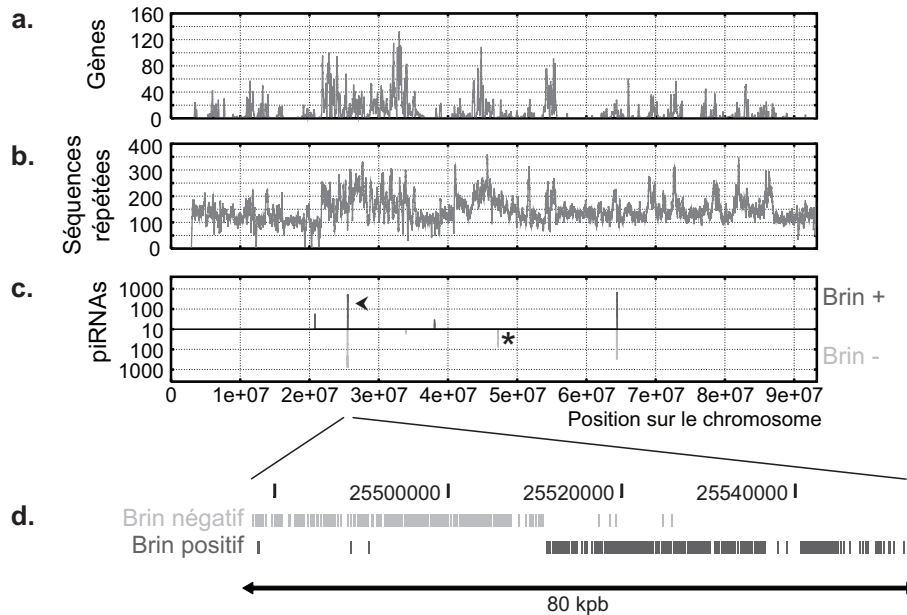


Fig. 1. Les piARNs proviennent de *clusters* génomiques. Densité en gènes (a), en séquences répétées (b) et en piARNs (c) le long du chromosome 17 de la souris. La flèche et l'astérisque désignent des *clusters* bidirectionnel et unidirectionnel, respectivement. d. Vue agrandie d'un *cluster* bidirectionnel de ~ 80 kpb du chromosome 17. Chaque trait vertical représente au moins un clone de piRNA. Les clones sont répartis par brin d'appartenance.

La diversité des défauts morphologiques des mutants *Piwi* et leur ressemblance avec les phénotypes de nombreux autres mutants de la gamétogenèse a rendu pendant longtemps la détermination de la fonction de ces gènes difficile. C'est pourquoi de nombreux groupes se sont tournés vers leur analyse biochimique.

Les piARNs, petits ARNs partenaires des Piwis dans la lignée germinale murine

Les Argonautes sont généralement associés à de petits ARNs qui les guident vers des cibles complémentaires. Chez les mammifères, les Agos se lient aux siARNs et aux miARNs. L'hypothèse que les protéines *Piwi* auraient pour partenaires une troisième classe de petits ARNs, dont les séquences pourraient révéler la fonction des *Piwis*, a amené cinq groupes à analyser les petits ARNs des testicules de souris. En 2006, ces groupes ont publié la découverte d'une classe de petits ARNs spécifiques à la lignée germinale (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Grivna *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006).

Deux protéines *Piwi*, *MIWI* et *MILI*, interagissent avec ces petits ARNs qui ont donc été appelés *Piwi-interacting RNAs* ou piARNs. Selon qu'ils sont associés à *MIWI* ou à *MILI*, les piARNs mesurent 28-30 ou 26-28 nucléotides et sont donc significativement plus longs que les siARNs et les

miARNs. Au cours de la spermatogenèse, ils deviennent extrêmement abondants en milieu de prophase I jusqu'au stade des spermatides rondes, où leur nombre a été estimé à quelques millions par cellule (Aravin *et al.*, 2006).

Les cinq groupes ont séquencé jusqu'à 150 000 piARNs de l'Homme, de la souris et du rat. Ces séquences ont révélé plusieurs caractéristiques surprenantes. Tout d'abord, environ 94 % des clones commencent par un uracile. Bien que l'on retrouve cette même tendance chez les siARNs et les miARNs (Aravin *et al.*, 2003), la proportion de U en 5' est nettement plus forte chez les piARNs. Elle est probablement révélatrice de la spécificité de l'enzyme responsable de leur biogenèse.

On n'observe aucun enrichissement de séquences géniques dans la population de piARNs (moins de 1%), ni une proportion significative de séquences répétitives (17 % de transposons dans la population de piARNs contre 40 % dans le génome). En fait, environ 75% des piARNs correspondent à des séquences non annotées du génome.

De même, l'analyse de l'origine génomique des piARNs a montré que la plupart des séquences (84 %) peuvent être attribuées à un unique emplacement dans le génome, qui est donc nécessairement leur lieu de transcription. Ces emplacements ne sont pas distribués au hasard (Figure 1). En fait, 96 % des clones proviennent d'une centaine de blocs génomiques

(ou *clusters*). Ces *clusters* mesurent entre 10 000 et 90 000 paires de bases et contiennent, dans certaines analyses, plus de 4 000 séquences de piARNs. En accord avec l'analyse des annotations, les *clusters* sont pauvres en gènes et en éléments transposables.

Le plus frappant dans ces *clusters* est la préférence des piARNs pour l'un ou l'autre brin de l'ADN. Certains *clusters*, généralement les plus gros, sont qualifiés de bidirectionnels. Ils peuvent être divisés en deux sous-parties, à l'intérieur desquelles presque tous les piARNs proviennent d'un seul brin. Les orientations respectives des deux sous-parties du *cluster* sont toujours divergentes, comme si un promoteur unique au centre du *cluster* guidait la production des deux sous-ensembles de piARNs. De leur côté, les *clusters* plus petits sont unidirectionnels, c'est-à-dire que les piARNs proviennent, en grande majorité, d'un seul brin. Cette asymétrie suggère fortement que les piARNs sont produits à partir d'un long transcrypt simple brin (Watanabe *et al.*, 2006). De toutes les classes de petits ARN connues, celle des piARNs pourrait donc être la première à ne pas avoir de précurseurs double brin.

La comparaison des populations de piARNs des trois espèces de mammifères analysées (souris, rat, Homme) montre que les piARNs sont, individuellement, très peu conservés. En revanche, les principaux *clusters* de piARNs se situent dans des régions de synténie conservée (Girard *et al.*, 2006), ce qui suggère deux hypothèses : ou bien une minorité fonctionnelle de piARNs est la cause de la pression évolutive sur les *clusters* entiers, ou bien c'est l'emplacement génomique des *clusters* qui importe et non pas leur séquence.

Malgré les caractéristiques uniques des piARNs, les informations fournies par leur séquençage ne sont pas suffisantes pour déterminer leur fonction. Il faut donc se tourner vers la drosophile, où les analyses génétiques sont plus poussées, pour éclairer la fonction des Piwi murins.

Des pièges à transposons chez la drosophile

Chez la drosophile, de nombreuses données vont dans le sens d'un rôle des protéines Piwi dans la répression de transposons (Vagin *et al.*, 2006). Plusieurs lignées mutantes ont été isolées pour deux des trois gènes, Piwi et Aubergine. Les cellules germinales des mutants *piwi* contiennent des niveaux élevés de transcrits de transposons (Kalmykova *et al.*, 2005, Sarot *et al.*, 2004). De plus, des mutations *piwi* sont des suppresseurs de variéation par effet de position (PEV) (Pal-Bhadra *et al.*, 2004). Dans les cellules ovariennes des mutants *aub*, on observe de même une sur-expression d'éléments transposables (Savitsky *et al.*,

2006, Vagin *et al.*, 2004), tandis que dans les cellules testiculaires, le locus répétitif *Stellate* est déréprimé (Aravin *et al.*, 2004, Aravin *et al.*, 2001).

Plus récemment les petits ARNs associés à Piwi, Aub et Ago3 ont été clonés (Brennecke *et al.*, 2007, Saito *et al.*, 2006). Ils mesurent 24-27 nucléotides et 80 % séquences associées à Piwi et Aub commencent par un uracile. Leurs caractéristiques générales sont donc très proches des piARNs murins. Cependant, à l'inverse de ceux-ci, les piARNs de la drosophile correspondent massivement à des éléments transposables (plus de 75%). Ainsi le raisonnement par homologie constitue un argument en faveur d'un rôle des Piwis murins dans la répression des transposons, tandis que les séquences des piARNs de la souris contredisent cette hypothèse. Comment réconcilier les données sur les mammifères avec celles sur la mouche ? Les piARNs de deux clades sont-ils si différents ?

Une analyse plus poussée des piARNs de la drosophile a fourni un élément de réponse. L'origine génomique d'un piARN n'est connue sans ambiguïté que si la séquence de ce piARN est unique dans le génome. En analysant l'ensemble des séquences uniques parmi les piARNs clonés, Brennecke *et al.* (2007) ont montré que celles-ci ont tendance à former des *clusters*, de manière très similaire aux piARNs murins.

De plus, certains de ces *clusters* sont très bien caractérisés génétiquement. L'un d'entre eux correspond au locus *Flamenco* qui est essentiel à la répression de certains transposons, notamment Gypsy, ZAM et Idéfix (Desset *et al.*, 2003, Pelisson *et al.*, 1994, Prud'homme *et al.*, 1995). Une insertion d'un élément P dans la région *Flamenco* provoque la dérépression de ces éléments transposables, et pourtant, aucun des gènes codants voisins ne semble responsable de ce phénotype (Mével-Ninio *et al.*, 2007). L'existence d'un *cluster* de piARNs en aval de l'insertion de l'élément P suggère que ce *cluster* contrôle Gypsy, ZAM et Idéfix et que ce contrôle est perturbé par l'élément P. Plusieurs arguments confortent cette hypothèse. Tout d'abord, *Flamenco* contient de nombreuses copies anti-sens de Gypsy, ZAM et Idéfix (Robert *et al.*, 2001). De plus, les mutants *flamenco* ont un phénotype identique aux mutants *piwi* (Sarot *et al.*, 2004). Or les piARNs du *cluster* *Flamenco* sont majoritairement associés à Piwi et sont quasiment absents chez les mouches *flamenco* (Brennecke *et al.*, 2007). Enfin, l'existence d'une corrélation inverse entre la présence d'un type de transposon (I-element) dans la région hétérochromatique entourant le locus et la réactivité de la lignée à cet élément pourrait constituer une preuve supplémentaire du rôle de *Flamenco* dans la répression des transposons (Dimitri & Bucheton, 2005).

De manière similaire à Flamenco, le *cluster* X-TAS est impliqué dans le contrôle des éléments P (Marin *et al.*, 2000; Ronsseray *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2002), de concert avec Aubergine (Reiss *et al.*, 2004). L'analyse génétique du locus X-TAS montre aussi que les piARNs sont capables d'agir en *trans*, puisque l'insertion d'un élément P contenant LacZ dans le *cluster* X-TAS provoque la répression d'autres transgènes LacZ euchromatiques (Roche & Rio, 1998, Ronsseray *et al.*, 1998).

L'idée que les *clusters* constituent des réservoirs à piARNs capables de contrôler les éléments transposables évoque un modèle de piège à transposons. Toute la difficulté d'un système de défense contre les éléments répétitifs réside dans la capacité à distinguer les vrais gènes de ces gènes parasites. Chez les plantes et la levure, le modèle dominant est que les transposons produisent des transcrits aberrants (généralement double brin), qui sont reconnus par une machinerie spécialisée. Cependant, la présence de transcrits aberrants est un signe indirect de l'existence de transposons. Il semblerait en revanche que les animaux se servent des propriétés fondamentales des transposons, à savoir qu'ils sont capables de sauter d'un endroit à l'autre du génome et qu'ils créent de nombreuses copies d'eux-mêmes.

Le piège à transposons exploiterait précisément ces deux caractéristiques (Figure 2). Tout d'abord, un locus est choisi dans une région pauvre en séquences codantes. Ce locus génère des longs transcrits qui sont ensuite découpés en piARNs. Il devient ainsi un cluster de piARNs. Si, par le jeu des probabilités, un transposon s'insère dans le *cluster*, de préférence dans l'orientation anti-sens, alors sa séquence devient partie intégrante du long transcrit précurseur. Des piARNs complémentaires du transposon sont produits. Ces piARNs sont alors capables de réprimer à la fois cet élément mais aussi tous les éléments de même séquence dans le reste du génome. De piège, le *cluster* devient un réservoir d'information sur les transposons présents dans le génome.

Le système de détection serait encore plus raffiné s'il y avait un « bout de fromage » au centre de ces pièges, capable d'attirer les transposons. La fréquence élevée d'insertion des éléments P dans le *cluster* X-TAS suggère qu'un tel mécanisme existe (Ronsseray *et al.*, 1989). Cependant, la nature de ce « fromage » est encore inconnue.

En plus de fournir un élégant modèle de répression des éléments répétitifs, l'analyse chez la drosophile montre que les *clusters* sont un autre point commun entre les piARNs des différents clades.

Les protéines Piwi et la répression de transposons chez la souris

Les ressemblances entre les piARNs de la souris et de la drosophile sont trop nombreuses pour que les fonctions des protéines Piwis ne soient pas similaires. Effectivement, au moins une des protéines murines, MIWI2, semble jouer un rôle dans la répression des transposons (Carmell *et al.*, 2007).

Les cellules germinales des mâles *miwi2* surexpriment plusieurs classes de transposons. Les éléments L1, des rétrotransposons de type LINE (*long interspersed elements*), sont transcrits à des niveaux dix fois plus élevés chez les homozygotes nuls que chez les hétérozygotes. De même, on observe une surexpression d'un facteur 3 des éléments IAP, de type LTR. En revanche, les mutants *miwi2* expriment des niveaux normaux de SINEs (*short interspersed elements*) B1 et B2.

Chez les plantes et la levure, les éléments mobiles sont réprimés par l'ARNi au niveau transcriptionnel, par le biais de la formation d'hétérochromatine (Lippman & Martienssen, 2004). Les petits ARNs responsables recrutent des histones méthyltransférases qui méthylent la lysine 9 des histones H3. Chez les plantes, les petits ARNs déclenchent également la méthylation de l'ADN de transposons, par un mécanisme appelé RdDM (pour *RNA-directed DNA methylation*). Ainsi, plusieurs mutants de l'ARNi chez *Arabidopsis thaliana* échouent à méthyler l'ADN répétitif. De la même manière, les testicules mutants *miwi2* présentent des niveaux anormalement bas de méthylation des éléments L1 et IAP. Bien que son implication directe reste à démontrer, Miwi2 est néanmoins le premier Argonaute à jouer un rôle dans un processus naturel de méthylation des transposons.

Conclusion

Ces dernières années, les connaissances sur les protéines Piwis ont grandement progressé grâce au séquençage massif des piARNs. Non seulement celui-ci a mis en évidence les grandes similitudes entre les différents clades d'animaux mais il a fourni un modèle séduisant de mécanisme de détection et de lutte contre les transposons. Les piARNs proviennent de *clusters* situés dans des régions bien définies du génome. Chez la drosophile, certains de ces *clusters* servent à la fois de détecteurs de transposons et de réservoirs d'immunité contre ces éléments parasites. Chez la souris, les *clusters* de piARNs connus semblent trop pauvres en transposons pour jouer un tel rôle. Néanmoins, au moins un gène Piwi, Miwi2, est impliqué dans la répression transcriptionnelle des éléments mobiles.

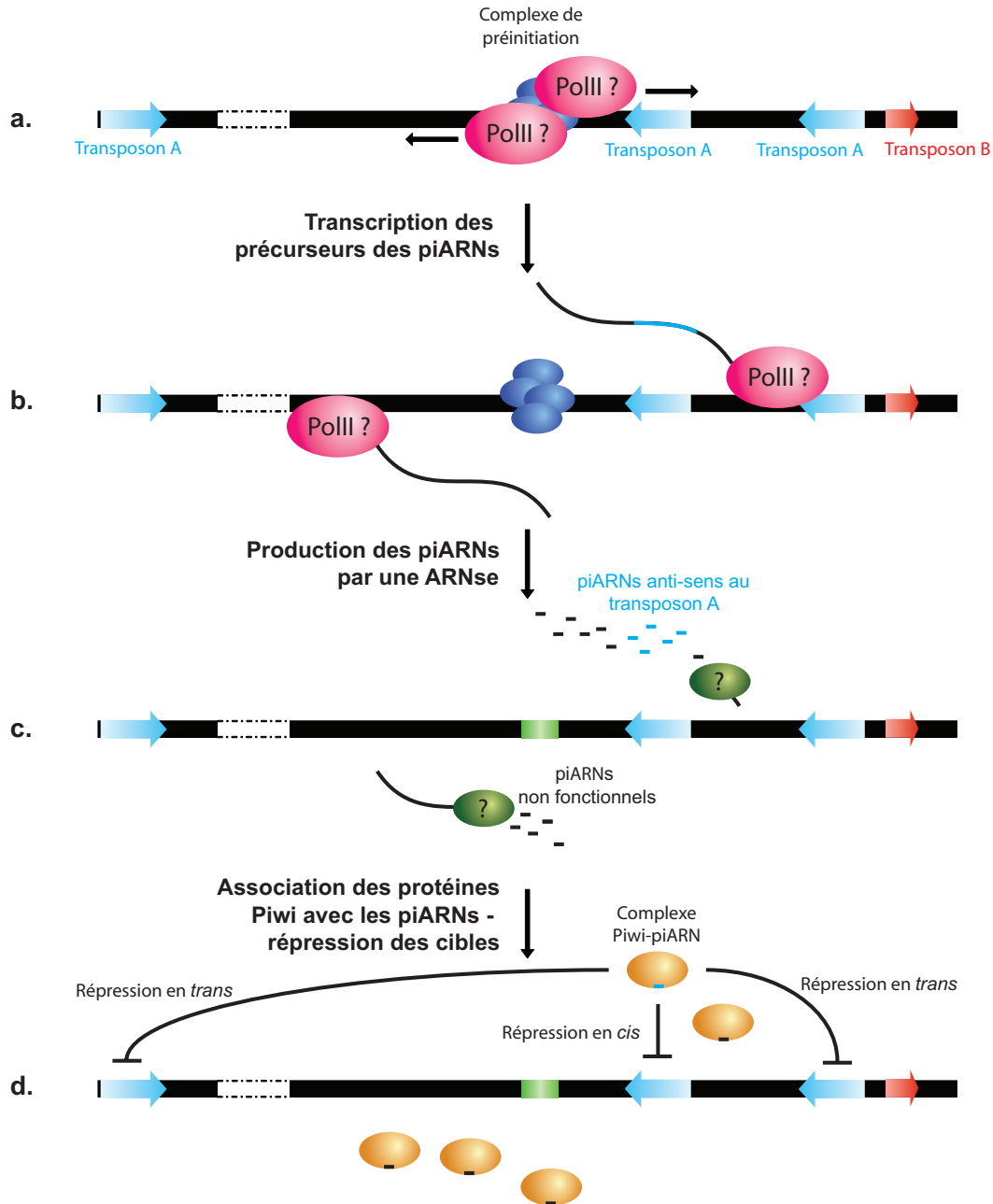


Fig. 2. Le modèle du piège à transposons. Un *cluster* de piARNs, établi dans une région pauvre en séquences codantes, devient transcriptionnellement actif à chaque cycle de gamétogenèse (a). Il produit alors des précurseurs de piARNs, sous la forme de longs ARNs transcrits (b), qui sont découpés en piARNs par une enzyme encore indéterminée (c). Tant que le *cluster* est vierge de toute séquence étrangère, ces piARNs sont non fonctionnels (en noir). Mais si un transposon s'est inséré dans une orientation anti-sens au *cluster* alors les précurseurs produits par le *cluster* contiennent la séquence du transposon (en bleu). Des piARNs complémentaires du transposon sont produits. Ils sont ensuite incorporés dans un complexe comprenant une protéine Piwi et peuvent cibler à la fois leur transposon d'origine (*cis*) ou les transposons de même séquence dans le reste du génome (*trans*) (d).

Ceci laisse deux possibilités : soit le contenu pauvre en transposons des *clusters* murins est suffisant pour assurer une défense robuste, soit il existe chez les mammifères une seconde population de piARNs, moins abondante et plus riche en séquences répétées. Dans ce dernier cas, quel serait le rôle des piARNs les plus abondants ?

Remerciements

Les auteurs remercient Claire Biot et Joëlle Coëffin pour leur relecture du manuscrit. AG est bénéficiaire d'une bourse de la Florence Gould Foundation, à la Watson School of Biological Sciences. GJH est un chercheur du Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

Références

- Ambros V., The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431, 350-355
- Aravin A., Gaidatzis D., Pfeffer S., Lagos-Quintana M., Landgraf P., Iovino N., Morris P., Brownstein M. J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Chien M., Russo J. J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M. & Tuschl T., A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442, 203-207
- Aravin A. A., Klenov M. S., Vagin V. V., Bantignies F., Cavalli G. & Gvozdev V. A., Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 6742-6750
- Aravin A. A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J. & Tuschl T., The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 2003, 5, 337-3350
- Aravin A. A., Naumova N. M., Tulin A. V., Vagin V. V., Rozovsky Y. M. & Gvozdev V. A., Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*, 2001, 11, 1017-1027
- Brennecke J., Aravin A. A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R. & Hannon G. J., Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128, 1089-1103
- Carmell M. A., Girard A., van de Kant H. J., Bourc'his D., Bestor T. H., de Rooij D. G. & Hannon G. J., MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12, 503-514
- Carmell M. A., Xuan Z., Zhang M. Q. & Hannon G. J., The Argonaute family : tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2002, 16, 2733-2742
- Cox D. N., Chao A., Baker J., Chang L., Qiao D. & Lin H., A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 1998, 12, 3715-3727
- Cox D. N., Chao A. & Lin H., piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 2000, 127, 503-514
- Cullen B. R., Is RNA interference involved in intrinsic antiviral immunity in mammals? *Nat. Immunol.*, 2006, 7, 563-567
- Deng W. & Lin H., miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell.*, 2002, 2, 819-830
- Desset S., Meignin C., Dastugue B. & Vaury C., COM, a heterochromatic locus governing the control of independent endogenous retroviruses from *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2003, 164, 501-509
- Dimitri P. & Bucheton A., I element distribution in mitotic heterochromatin of *Drosophila melanogaster* reactive strains : identification of a specific site which is correlated with the reactivity levels. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 110, 160-164
- Girard A., Sachidanandam R., Hannon G. J. & Carmell M. A., A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, 442, 199-202
- Grivna S. T., Beyret E., Wang Z. & Lin H., A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20, 1709-1714
- Hannon G. J., RNA interference. *Nature*, 2002, 418, 244-51
- 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
- Kalmykova A. I., Klenov M. S. & Gvozdev V. A., Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33, 2052-2059
- 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
- Kuramochi-Miyagawa S., Kimura T., Ijiri T. W., Isobe T., Asada N., Fujita Y., Ikawa M., Iwai N., Okabe M., Deng W., Lin H., Matsuda Y. & Nakano T., Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131, 839-849
- Kuramochi-Miyagawa S., Kimura T., Yomogida K., Kuroiwa A., Tadokoro Y., Fujita Y., Sato M., Matsuda Y. & Nakano T., Two mouse piwi-related genes : miwi and mili. *Mech Dev*, 2001, 108, 121-133
- Lau N. C., Seto A. G., Kim J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Bartel D. P. & Kingston R. E., Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, 2006, 313, 363-367
- Lin H. & Spradling A. C., A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 1997, 124, 2463-2476
- Lippman Z. & Martienssen R., The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 2004, 431, 364-370

- Marin L., Lehmann M., Nouaud D., Izaabel H., Anxolabehere D. & Ronsseray S., P-Element repression in *Drosophila melanogaster* by a naturally occurring defective telomeric P copy. *Genetics*, 2000, 155, 1841-1854
- Mével-Ninio M., Pelisson A., Kinder J., Campos A. R. & Bucheton A., The flamenco locus controls the gypsy and ZAM retroviruses and is required for *Drosophila* oogenesis. *Genetics*, 2007, 175, 1615-1624
- Morita S., Horii T., Kimura M., Goto Y., Ochiya T. & Hatada I., One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 2007, 89, 687-696
- 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
- Pelisson A., Song S. U., Prud'homme N., Smith P. A., Bucheton A. & Corces V. G., Gypsy transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila* flamenco gene. *Embo J*, 1994, 13, 4401-4411
- Prud'homme N., Gans M., Masson M., Terzian C. & Bucheton A., Flamenco, a gene controlling the gypsy retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1995, 139, 697-711
- Reiss D., Josse T., Anxolabehere D. & Ronsseray S., aubergine mutations in *Drosophila melanogaster* impair P cytotypic determination by telomeric P elements inserted in heterochromatin. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272, 336-343
- Robert V., Prud'homme N., Kim A., Bucheton A. & Pelisson A., Characterization of the flamenco region of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics*, 2001, 158, 701-713
- Roche S. E. & Rio D. C., Trans-silencing by P elements inserted in subtelomeric heterochromatin involves the *Drosophila* Polycomb group gene, Enhancer of zeste. *Genetics*, 1998, 149, 1839-1855
- Ronsseray S., Boivin A. & Anxolabehere D., P-Element repression in *Drosophila melanogaster* by variegating clusters of P-lacZ-white transgenes. *Genetics*, 2001, 159, 1631-1642
- Ronsseray S., Lehmann M. & Anxolabehere D., Copy number and distribution of P and I mobile elements in *Drosophila melanogaster* populations. *Chromosoma*, 1989, 98, 207-214
- Ronsseray S., Marin L., Lehmann M. & Anxolabehere D., Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by combinations of telomeric P-element reporters and naturally occurring P elements. *Genetics*, 1998, 149, 1857-1866
- Saito K., Nishida K. M., Mori T., Kawamura Y., Miyoshi K., Nagami T., Siomi H. & Siomi M. C., Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev*, 2006, 20, 2214-2222
- Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A. & Pelisson A., Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics*, 2004, 166, 1313-1321
- Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S. & Shimizu N., Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, 2003, 82, 323-330
- Savitsky M., Kwon D., Georgiev P., Kalmykova A. & Gvozdev V., Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes Dev*, 2006, 20, 345-354
- Schmidt A., Palumbo G., Bozzetti M. P., Tritto P., Pimpinelli S. & Schafer U., Genetic and molecular characterization of sting, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1999, 151, 749-760
- Schupbach T. & Wieschaus E., Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics*, 1991, 129, 1119-1136
- Song J. J. & Joshua-Tor L., Argonaute and RNA-getting into the groove. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, 16, 5-11
- Stuart J. R., Haley K. J., Swedzinski D., Lockner S., Kocian P. E., Merriman P. J. & Simmons M. J., Telomeric P elements associated with cytotypic regulation of the P transposon family in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2002, 162, 1641-1654
- Vagin V. V., Klenov M. S., Kalmykova A. I., Stolyarenko A. D., Kotelnikov R. N. & Gvozdev V. A., The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*. *RNA Biol.*, 2004, 1, 54-58
- Vagin V. V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V. & Zamore P. D., A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 2006, 313, 320-324
- Watanabe T., Takeda A., Tsukiyama T., Mise K., Okuno T., Sasaki H., Minami N. & Imai H., Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline : retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*, 2006, 20, 1732-1743