
Christophe Béclin
Hervé Vaucheret

L'inactivation épigénétique post-transcriptionnelle chez les végétaux : un mécanisme de résistance aux virus

Le développement de la transgénèse a permis de découvrir des phénomènes originaux d'inactivation de l'expression des gènes fondés sur la reconnaissance d'homologies de séquences. Bien qu'héritables par la mitose et par la méiose (comme des mutations classiques), ces phénomènes d'inactivation de gènes sont fréquemment réversibles (contrairement aux mutations) car ils n'impliquent aucune modification de la séquence nucléotidique de l'ADN. Les inactivations sont dues, soit à des modifications chimique et/ou structurale de l'ADN – altérant quantitativement ou qualitativement la transcription –, soit à des processus post-transcriptionnels aboutissant à la dégradation spécifique d'une population d'ARN. Plusieurs équipes ont démontré le rôle de ces processus dans le contrôle des transposons. Récemment, notre équipe a montré que les processus post-transcriptionnels permettaient aux plantes de se protéger contre certaines infections virales.

ADRESSE

C. Béclin, H. Vaucheret : Laboratoire de biologie cellulaire, UR 501, INRA, 78026 Versailles Cedex, France. email: beclin@versailles.inra.fr, vauchere@versailles.inra.fr

m/s n° 8-9, vol. 17, août-septembre 2001

L'inactivation épigénétique post-transcriptionnelle (PTGS: *post-transcriptional gene silencing*) correspond à la dégradation spécifique des ARN messagers (ARNm) codés par un transgène ainsi que de tous les ARN homologues présents dans la cellule [1]. La PTGS a été découverte fortuitement en 1990, simultanément par une équipe hollandaise et une

équipe américaine [2, 3]. Ces deux équipes cherchaient à accentuer la couleur pourpre des pétales d'une variété de *Pétunia*. Ils introduisirent par transformation génétique une copie supplémentaire du gène de la chalcone synthase, enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des pigments rouges, les anthocyanes. Parmi les transformants obtenus, certains présentaient des pétales blancs, tota-

lement dépigmentés. L'analyse moléculaire de ces transformants mit en évidence que cette dépigmentation résultait de la dégradation spécifique des ARNm de chalcone synthase [4]. Ainsi, on montrait pour la première fois que l'introduction d'une copie supplémentaire d'un gène pouvait entraîner simultanément son inactivation ainsi que celle du gène endogène. Ce phénomène a été nommé co-suppression car on pensait à l'époque que l'extinction simultanée des gènes endogènes et exogènes homologues découlait obligatoirement d'une interaction entre eux. Un phénomène similaire, baptisé *quelling*, a été mis en évidence chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa* [5]. Par la suite, de nombreux exemples de co-suppression ont été mis en évidence, affectant tout type de gène et toute espèce de plante, montrant qu'il n'y avait, au niveau des gènes inactivés, aucune spécificité de séquence ni de fonction, et qu'au niveau de l'organisme hôte, la faculté de déclencher la co-suppression semblait partagée par la majorité des espèces végétales. Parallèlement à ces observations, on s'est aperçu que des transgènes sans homologue endogène pouvaient également subir la PTGS, suggérant qu'il ne s'agissait pas d'un phénomène visant à régler spécifiquement l'expression des gènes endogènes [6]. Nous emploierons donc le terme de PTGS pour désigner les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle de façon générique, et nous n'emploierons le terme de co-suppression que dans des cas de PTGS affectant des transgènes homologues à des gènes endogènes. De nombreuses équipes travaillant sur différents (trans)gènes et différentes plantes ont caractérisé la PTGS et ont répertorié un certain nombre de ses propriétés.

- la PTGS ne modifie pas significativement l'activité transcriptionnelle des gènes inactivés. Ce résultat indique que la quantité, sinon la qualité, d'ARN produits reste inchangée et que le phénomène est essentiellement post-transcriptionnel [7];
- la PTGS s'accompagne d'une augmentation de la méthylation des cytosines des séquences transcrites [7]. Ce résultat ne permet cependant pas d'établir si la méthylation joue un

rôle dans le mécanisme de PTGS. En effet, elle pourrait ne constituer qu'une simple conséquence de la PTGS sans participer directement au processus;

- la mise en place de la PTGS est dynamique et met en jeu un signal spécifique de séquence capable de propager la PTGS d'un point de déclenchement local à l'ensemble de la plante. La nature de ce signal demeure inconnue. Sa spécificité vis-à-vis d'une population d'ARN laisse penser qu'il pourrait s'agir d'un acide nucléique [8];

- la PTGS s'accompagne d'une accumulation de petites molécules d'ARN (d'environ 25 nucléotides) homologues de l'ARNm du gène inactivé ou de son complémentaire (ARN anti-sens) [9]. Le rôle joué par ces molécules d'ARN dans le mécanisme de PTGS demeure mystérieux. En effet, ces molécules pourraient n'être que des produits de dégradation des molécules d'ARN apparaissant au cours du phénomène de PTGS. Nous détaillerons plus précisément

trois aspects de la PTGS que nous explorons dans notre laboratoire :

- son induction et la dynamique de sa mise en place;
- son contrôle génétique;
- son rôle biologique.

Déclenchement, propagation systémique et maintien de la PTGS

La PTGS est un phénomène dynamique

Notre équipe a développé un système d'étude fondé sur la co-suppression des gènes impliqués dans la réduction du nitrate. L'assimilation du nitrate chez les plantes se fait par sa réduction en ion ammonium. Deux enzymes permettent cette transformation: la nitrate réductase qui réduit l'ion nitrate NO_3^- en ion nitrite NO_2^- puis la nitrite réductase qui permet la synthèse d'ion ammonium NH_4^+ à partir du nitrite. Des mutations dans les gènes endogènes *Nia* codant pour la nitrate réductase ou *Nii* codant pour la nitrite réductase conduisent à une chlorose irréversible des feuilles. Cette chlorose résulte d'un dysfonctionnement des chloroplastes. En introduisant chez le tabac des gènes chimériques codant pour la nitrate

réductase ou pour la nitrite réductase sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, nous avons obtenu des transformants co-supprimés pour le transgène et les gènes endogènes homologues [10]. Environ 20 % des lignées transgéniques homozygotes monolocus obtenues présentaient des degrés variables de co-suppression, le pourcentage de plantes co-supprimées variant entre 0 % et 100 % selon la lignée considérée. Ce pourcentage était stable d'une génération à une autre, indiquant qu'il reflétait la probabilité qu'une lignée subisse la co-suppression.

La co-suppression de ces gènes se traduisant par une chlorose irréversible, la mise en place spatio-temporelle de la PTGS a pu être suivie sans recourir à aucune analyse destructive. Nous avons montré que la mise en place du phénomène est dynamique. Elle débute par l'apparition d'un point chlorotique sur une feuille. La co-suppression se propage ensuite par les tissus vasculaires (*via* le phloème des tiges et les nervures des feuilles) et finit par affecter l'ensemble de la plante. Elle se maintient ensuite dans les tissus âgés comme dans les tissus néoformés [10]. Ces observations nous ont amenés à proposer que la PTGS était un phénomène dynamique qui pouvait être décomposé en au moins 3 étapes distinctes: le déclenchement, la propagation et le maintien.

Déclenchement

L'étude de cette étape est rendue particulièrement difficile par son caractère localisé et stochastique. Les enseignements obtenus sont essentiellement indirects. Ils découlent principalement de l'étude des paramètres qui favorisent, ou non, l'apparition du phénomène. Ces études ont abouti à la mise en évidence de deux types de locus transgéniques particulièrement aptes à déclencher la PTGS.

Le premier correspond à des insertions de transgènes monocopies fortement transcrits [11]. Dans la plupart des cas, le pourcentage de plantes touchées par la PTGS est supérieur lorsque le transgène se trouve à l'état homozygote plutôt qu'à l'état hémizygote. Cette observation semble liée à l'importance de la quantité d'ARN produit. En effet, plusieurs auteurs ont montré que

l'efficacité de déclenchement la PTGS d'un transgène était corrélée positivement avec l'activité transcriptionnelle du promoteur réglant la transcription de ce transgène. Ces résultats ont amené certains auteurs à introduire la notion de niveau seuil d'ARN à partir duquel la PTGS serait induite [12]. Ce seuil d'ARN concerne non seulement les ARN codés par le transgène mais, dans les cas de co-suppression, également les ARNm du gène endogène. En effet, le pourcentage de plantes touchées par la PTGS est supérieur dans une lignée transgénique portant un gène endogène actif par rapport à une lignée renfermant le même locus transgénique mais dont le gène endogène est inactif [11].

Le deuxième type de locus transgénique déclenchant la PTGS correspond à des insertions de deux copies en tandem inversé du transgène, quel que soit le niveau de transcription de celui-ci [4, 12]. Pour expliquer ce résultat, apparemment en contradiction avec le modèle de l'effet seuil, on a évoqué la production de duplex d'ARN (issus de la production de transcrits antiparallèles couvrant l'ensemble du tandem inversé) capables de déclencher la PTGS. Cette hypothèse a ensuite été confirmée en construisant des transgènes constitués d'une répétition inversée, c'est-à-dire portant la même séquence clonée successivement en orientation sens puis en orientation anti-sens. Ces transgènes, qui produisent des ARN ayant une structure secondaire en « épingle à cheveu » très stable, se sont avérés particulièrement efficaces pour provoquer l'inactivation d'un gène endogène ou d'un transgène homologue avec la partie répétée-inversée du transgène [13]. Ces expériences suggéraient donc fortement l'intervention de duplex d'ARN dans les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle chez les végétaux. Simultanément, le phénomène de RNAi (*RNA interference*) a été découvert chez *Caenorhabditis elegans* [14] puis chez de nombreux autres organismes, dont la souris [15]. Lorsque l'on injecte localement dans les cellules d'un animal un duplex d'ARN produit *in vitro*, on provoque l'inactivation post-transcriptionnelle des gènes endogènes homologues aux ARN injectés dans

l'ensemble de l'animal. Par la suite, on a montré que l'on pouvait provoquer un mécanisme similaire au RNAi lorsque le duplex d'ARN était engendré au sein de la cellule non plus par injection d'ARN produit *in vitro* mais *via* la transcription d'un transgène constitué d'une répétition inversée [16]. La découverte du RNAi suggère donc la conservation, chez la plupart des organismes vivants, d'un mécanisme ancestral aboutissant, *via* la reconnaissance d'un duplex d'ARN anormalement présent dans la cellule, à la destruction de tous les ARN homologues.

En conclusion, deux types de transgènes favorisent le déclenchement de la PTGS, des transgènes monocopies exprimés sous le contrôle de promoteurs forts, et des transgènes en tandem inversé ou portant des répétitions internes. Cependant, il n'a pas encore été démontré que les événements de PTGS déclenchés par l'un ou l'autre de ces types de transgènes étaient en tout point identiques. Si tel était le cas, il faudra alors comprendre comment des transgènes, *a priori* très différents, peuvent provoquer la même cascade d'événements, et en particulier comment des transgènes monocopies exprimés sous le contrôle de promoteurs forts peuvent induire la dégradation d'ARN homologues et la formation de petits ARN antisens. On sait toutefois que la plupart des ARNm endogènes sont potentiellement capables de former des structures secondaires (duplex) en raison de la présence de petites séquences complémentaires internes [17]. Ces duplex sont peu stables car les régions homologues sont généralement courtes. Ainsi, l'équilibre chimique entre « forme secondaire repliée » et « forme relâchée » est fortement déplacé vers la « forme relâchée ». Chez une plante sauvage, la « forme secondaire repliée » n'atteint jamais une concentration intracellulaire significative susceptible d'entraîner une induction de la machinerie de PTGS. En revanche, cette concentration pourrait être atteinte lors de l'introduction de transgènes exprimés sous le contrôle de promoteurs forts. Alternativement, l'utilisation de promoteurs forts pourrait augmenter la proportion intracellulaire d'ARN messagers aberrants (ARNab) produits lors d'interruptions accidentelles de la

transcription. Ces ARNab pourraient servir de matrice à une ARN polymérase ARN dépendante endogène (RdRP : *RNA-dependent RNA polymerase*), conduisant à la formation d'ARN complémentaire (ARNc) et donc à la formation de duplex d'ARN semblables à ceux formés par des transgènes en tandem inversé ou portant des répétitions internes [11].

Propagation systémique de la PTGS

La dynamique de la propagation de la chlorose issue de la co-suppression de la nitrate réductase suggère qu'un signal est produit par les cellules dans lesquelles la co-suppression est déclenchée, puis exporté vers les autres cellules, mettant ainsi en route la co-suppression de façon systémique. Compte tenu du mode de propagation de la chlorose qui, dans un premier temps, suit les nervures, ce signal mobile doit emprunter les tissus vasculaires [10]. Ce mode de propagation est très voisin de celui des virus. Afin de tester l'hypothèse de l'existence d'un signal de PTGS, des expériences de greffe ont été entreprises. Des tabacs transgéniques non co-supprimés ont été greffés sur des porte-greffes transgéniques co-supprimés. La greffe a provoqué l'induction de la co-suppression dans le greffon avec une fréquence de 100 %, à condition que le transgène du porte-greffe et celui du greffon soient de même nature (*figure 1*) [8]. Au contraire, lorsque ceux-ci étaient différents (par exemple le greffage d'un greffon non co-supprimé portant un transgène de nitrate réductase sur un porte-greffe co-supprimé pour la nitrite réductase, ou le greffage d'un greffon non co-supprimé portant un transgène de nitrite réductase sur un porte-greffe co-supprimé pour la nitrate réductase), la co-suppression n'était jamais induite dans le greffon [8]. Ces expériences mettent bien en évidence l'existence d'un signal spécifique de séquence, émis par les tissus subissant la PTGS, et entraînant le déclenchement de la PTGS dans les tissus le recevant. Compte tenu de son caractère « spécifique de séquence », il est très probable que ce signal est constitué, au moins en partie, d'acide nucléique. Comme les seuls acides nucléiques mobiles identifiés chez les plantes sont des ARN,

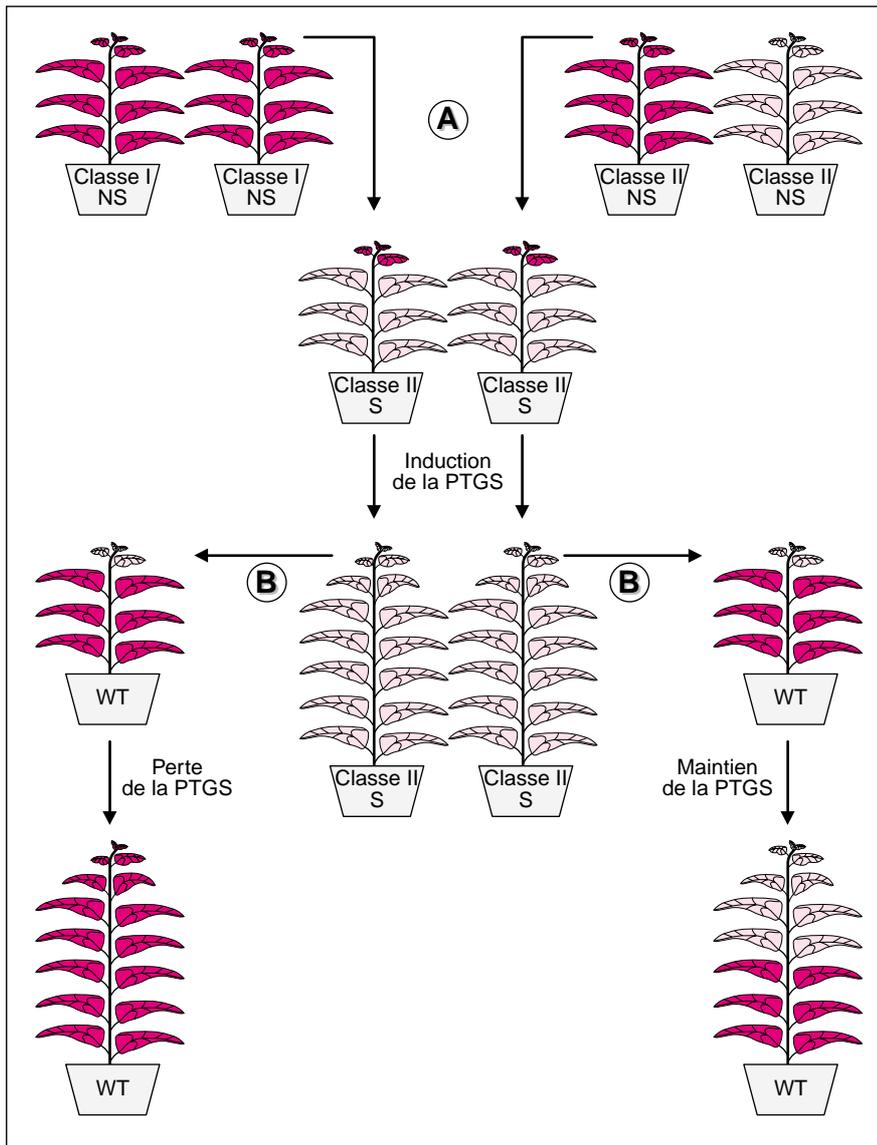


Figure 1. **Mise en évidence d'un signal systémique de PTGS « spécifique de séquence » et d'une composante « maintien » dans le processus de PTGS.** Dans les expériences décrites dans ce schéma, les lignées transgéniques dont sont issus les greffons et les porte-greffes portent un même transgène codant pour la nitrate réductase. **A. Mise en évidence d'un signal systémique de PTGS.** La greffe de l'apex d'une plante non chlorotique (dans lequel les gènes et transgènes de nitrate réductase sont actifs) sur un porte-greffe chlorotique (dans lequel la PTGS de la nitrate réductase est déclenchée) induit la PTGS de la nitrate réductase dans le greffon, que le greffon provienne d'une lignée apte à déclencher spontanément la PTGS de la nitrate réductase (classe II) ou inapte à la déclencher (classe I). **B. Mise en évidence d'une composante maintien de la PTGS.** Lorsque les greffons dans lesquels la PTGS a été induite par greffe sont « dégreffés » et regreffés sur un porte-greffe sauvage, la PTGS est maintenue dans les greffons de classe II alors qu'elle disparaît au cours du développement des greffons de classe I.

le signal systémique de la PTGS pourrait donc être un ARN (cet ARN pouvant être sous forme simple ou double brin, lié ou non à une protéine).

Maintien de la PTGS

Une fois induite, la PTGS est parfaitement stable au cours du développement de la plante, et aucune inversion

n'est observée dans les tissus somatiques, suggérant un processus actif de maintien du phénomène. L'existence d'une composante « maintien » a été confirmée par des expériences de greffe. Après avoir déclenché la PTGS de la nitrate réductase dans un greffon, celui-ci a été « dégreffé » et regreffé sur un porte-greffe sauvage. Certaines lignées ont maintenu la PTGS dans les tissus néoformés alors que d'autres ont montré un retour vers un phénotype sauvage (figure 1) [18]. Cette expérience indiquait donc que la co-suppression de la nitrate réductase induite par greffe pouvait ne pas être maintenue dans certaines lignées. L'analyse a montré que seules les lignées transgéniques incapables de déclencher la PTGS spontanément, mais induites par greffe, ne maintenaient pas la PTGS après dégreffage. Au contraire, toutes les lignées capables de déclencher spontanément la PTGS, même à une fréquence faible, maintenaient toujours la PTGS après dégreffage [18]. Ces résultats suggèrent donc que les lignées incapables de maintenir la PTGS perçoivent le signal de PTGS émis par des tissus co-supprimés mais sont incapables, en réponse, d'en produire à leur tour.

La capacité d'une lignée transgénique de (re)produire le signal de PTGS et de maintenir la PTGS dépend donc de la localisation et/ou de la structure du locus transgénique et fait donc intervenir une composante au niveau de l'ADN du transgène. Des modifications chimiques (méthylation de l'ADN, acétylation des histones) et/ou structurales (remodelage de la chromatine) pourraient constituer une marque épigénétique induite en réponse à la perception du signal, permettant de maintenir la PTGS au cours du développement de la plante. L'apposition de cette marque dans les tissus néoformés pourrait se faire soit sur un mode conservatif au moment de la réplication de l'ADN, soit *de novo* dans chaque cellule en réponse à la perception du signal de PTGS émis par les cellules co-supprimées. Récemment, nous avons montré que le maintien de la PTGS était affecté chez un mutant de méthylation, renforçant ainsi l'hypothèse d'une implication de cette modification de l'ADN dans cette étape de la PTGS (voir plus loin) [19]. Les différentes expériences décrites dans ce paragraphe ont permis de

mieux décrire le mécanisme et la dynamique de la PTGS au niveau de la plante entière. Cependant, de nombreux points restent encore mystérieux :

– quelle est la nature de l'événement initial ?

– quelle cascade d'événements conduit à la dégradation totale des ARN ?

– quelle est la nature du signal systémique de PTGS ?

– quels sont les mécanismes mis en jeu dans le noyau lors du déclenchement et du maintien ?

Il semblait difficile il y a quelques années d'espérer répondre à toutes ces questions par l'observation directe des événements. C'est pourquoi une approche génétique du phénomène a été entreprise.

Contrôle génétique de la PTGS

Isolement de mutants de PTGS

Afin d'isoler des mutants affectés dans leur capacité de déclencher la PTGS, des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* portant des transgènes inactivés ont été soumises à une mutagenèse. Une première série de mutants dont la capacité de déclencher la PTGS était augmentée ont ainsi été isolés et baptisés *egs* (*enhancer of gene silencing*) [20]. Par la suite, notre équipe, puis une équipe anglaise, a isolé des mutants dont la capacité de déclencher la PTGS était inhibée. Ces mutants ont été baptisés *sgs* (*suppressor of gene silencing*) [7, 21] et *sde* (*silencing-defective*) [22]. Par ailleurs, des mutants déficients pour le *quelling* ont été isolés chez *Neurospora crassa* et baptisés *qde* (*quelling-defective*) [23-25], ainsi que des mutants déficients pour le RNAi chez *C. elegans* baptisés *rde* (*RNAi-defective*) ou *mut* (*mutator*) [26, 27]. Le clonage des gènes correspondants allait donc permettre de tester si PTGS, *quelling* et RNAi dérivait bien d'un même mécanisme ancestral, et de mieux comprendre les mécanismes intimes mis en jeu lors de ces phénomènes.

Caractérisation des gènes contrôlant négativement la PTGS

Depuis leur isolement, les mutants *egs* d'*Arabidopsis* ont été relativement peu caractérisés, et les gènes corres-

pondants, *EGS1* et *EGS2*, n'ont pas encore été clonés. Toutefois, un gène de tabac codant pour une protéine réglant négativement la PTGS a été récemment identifié. Ce gène, baptisé *rgs-CaM* car il règle la PTGS (*rgs*: *regulator of gene silencing*) et présente une homologie avec des gènes de calmoduline, inhibe la PTGS lorsqu'il est surexprimé [28]. Son mode d'action et son rôle dans un contexte sauvage n'ont pas encore été déterminés.

Caractérisation des gènes contrôlant positivement la PTGS

Nous avons montré que les mutants *sgs* d'*Arabidopsis* étaient déficients pour la PTGS de transgènes exogènes et pour la co-suppression de transgènes et de gènes endogènes homologues [7, 21], indiquant que les gènes *SGS* contrôlaient positivement la PTGS. Nous avons également montré que cette inhibition de la PTGS s'accompagnait d'une forte réduction de la méthylation de la séquence codante, confirmant la corrélation stricte entre PTGS et méthylation [7, 21]. Enfin, nous avons montré que les mutants *sgs* n'étaient pas affectés dans le contrôle de l'inactivation transcriptionnelle (TGS), indiquant la spécificité de ces mutations vis-à-vis de la PTGS [7, 21]. Nous avons donc entrepris d'isoler par clonage positionnel les gènes correspondants.

Le gène *SGS2* présente une forte homologie avec un ADNc de tomate dont le produit de traduction présente *in vitro* une activité RdRP mais dont la fonction *in vivo* n'était pas encore identifiée [21]. Cette protéine permet la synthèse, à partir d'une matrice ARN, d'un brin d'ARN complémentaire. La plupart des virus à ARN codent pour cette fonction qui leur permet de répliquer leur génome. Cependant, bien que partageant des activités similaires, les protéines virales et végétales ne présentent aucune similarité de séquence. L'existence d'une activité RdRP endogène était connue chez les plantes depuis plusieurs décennies; cependant, son rôle n'était pas connu. Le clonage du gène *SGS2* a donc permis, 30 ans après sa découverte, d'assigner une fonction à cette protéine. De plus, l'implication d'une activité RdRP dans le mécanisme de PTGS a permis d'expliquer l'origine des molécules

ARN anti-sens de 25 nucléotides identifiées chez les plantes inactivées [9]. Chez *N. crassa*, le gène *QDE-1* codant pour une RdRP potentielle est requis pour le *quelling* [23], tandis que chez *C. elegans*, le gène *EGO-1* codant pour une RdRP potentielle est requis pour le RNAi dans les lignées germinales [26, 27]. L'existence de protéines, codant pour des activités semblables, requises pour la PTGS, le *quelling* et le RNAi confirme l'origine commune de ces trois mécanismes.

Le gène *SGS3* code pour une protéine ne présentant aucune similarité avec des protéines connues chez les plantes ou dans les autres règnes eucaryotes. De plus, sa fonction ne peut être déduite de l'analyse informatique de sa séquence puisque aucune signature de domaine protéique connu ne peut être identifiée. Seul, un domaine *coiled-coil*, indiquant une structure secondaire particulière dans la partie carboxy-terminale de la protéine, a pu être identifié [21]. Cependant, la fonction biologique de ce genre de structure est encore obscure. Le fait qu'aucune protéine homologue à *SGS3* n'ait été trouvée chez *N. crassa*, ni chez *C. elegans* ou chez la drosophile (dont les génomes sont totalement séquencés) suggère que la fonction assurée par *SGS3* n'est pas requise pour le *quelling* et le RNAi et qu'elle représente une étape propre à la PTGS chez les plantes, apparue après la divergence des règnes ou perdue chez les animaux et les champignons. Le troisième gène contrôlant positivement la PTGS que nous avons identifié correspond à un gène préalablement identifié chez *Arabidopsis* comme participant au développement et baptisé *AGO1* [29]. En effet, les mutants *ago1* présentent une altération marquée du développement, affectant l'architecture de la plante et sa fertilité. L'analyse informatique de la séquence de la protéine *AGO1* a montré qu'elle présentait une forte similitude avec la protéine eIF2C de lapin probablement impliquée dans l'initiation de la traduction. Les défauts de développement entraînés par la mutation *ago1* avaient donc été imputés à un défaut de traduction (et donc d'expression) de gènes impliqués dans le développement de la plante. L'identification du gène *AGO1* comme élément contrôlant la PTGS assigne une nouvelle fonction à cette protéine. Chez *N. crassa*, le gène

QDE-2 codant pour une protéine homologue au facteur eIF2C est requis pour le *quelling* [25], tandis que chez *C. elegans*, le gène *RDE-1* codant pour une protéine homologue au facteur eIF2C est requis pour le RNAi [26, 27]. Malgré l'absence d'orthologues du gène *SGS3* chez *N. crassa* et *C. elegans*, l'existence de deux séries de protéines (*SGS2/QDE-1/EGO-1* et *AGO1/QDE-2/RDE-1*), codant pour des activités semblables, requises pour la PTGS, le *quelling* et le RNAi confirme définitivement l'origine commune de ces trois mécanismes.

Influence de mutations affectant la méthylation et la chromatine sur la PTGS

Les mutants *ddm1* et *met1* d'*Arabidopsis* ont été isolés sur la base d'une déméthylation générale du génome (de l'ordre de 70 %). Les gènes correspondants ont été clonés. Le gène *MET1* code pour l'ADN-méthyltransférase majoritaire d'*Arabidopsis* [30]. Le gène *DDM1* code pour une protéine de type SNF2/SWI2 impliquée dans le remodelage de la chromatine [31]. Son implication dans la méthylation du génome est indirecte; le changement de conformation de la chromatine induisant vraisemblablement une modification de l'accès à l'ADN de la machinerie de méthylation. Les mutants *ddm1* et *met1* présentent une inhibition de l'inactivation transcriptionnelle (TGS) qui s'accompagne d'une forte déméthylation des séquences promotrices et transcrites des transgènes [19].

Afin de tester l'hypothèse d'une implication épigénétique dans la PTGS (*voir plus haut*), nous avons testé l'influence des mutations *ddm1* et *met1* sur la PTGS. Nous avons observé que ces deux mutations peuvent inhiber la PTGS. Cette inhibition s'accompagne d'une réduction de la méthylation de la séquence transcrite. Cependant, l'inhibition n'affecte pas 100 % des plantes, et les deux mutations n'ont pas le même effet. La mutation *ddm1* inhibe la PTGS dans l'ensemble de la plante, tout au long du développement. En revanche, la mutation *met1* inhibe la PTGS dans des secteurs de la plante, la quantité de secteurs dans lesquelles la PTGS est inhibée augmentant au cours du développement [19]. Le gène *MET1* semblerait donc

requis pour le maintien de la PTGS, alors que le gène *DDM1* pourrait être requis pour des étapes affectant le déclenchement du phénomène.

Ces résultats confirment donc l'existence d'une étape nucléaire (modification de l'ADN) dans la PTGS. Avec la découverte que la TGS, au même titre que la PTGS, pouvait être induite par la transcription d'un duplex d'ARN (dans ce cas, ce duplex est homologue à la région promotrice du gène inactivé) [32], ces résultats mettent en évidence pour la première fois un lien fonctionnel entre TGS et PTGS puisque les mutations *ddm1* et *met1* affectent les deux phénomènes. Cette découverte révèle une différence entre le RNAi et la PTGS puisque les génomes de *C. elegans* et de la drosophile (organismes sensibles au RNAi) ne sont pas méthylés.

Modèle de mécanisme de la PTGS

Malgré les nombreuses données engendrées récemment, il serait encore hasardeux de proposer un modèle très détaillé du mécanisme de PTGS. On peut toutefois tenter de situer les différents acteurs cellulaires identifiés (*figure 2*):

- la protéine DDM1 pourrait participer à l'initiation de la PTGS. L'absence de la protéine DDM1 à un stade précoce du développement pourrait induire, au niveau du transgène, la formation d'une structure de la chromatine héritable mitotiquement ne permettant pas le déclenchement de la PTGS (en empêchant, par exemple, la synthèse d'ARN sens aberrants);

- la protéine AGO1, homologue au facteur eIF2C, pourrait reconnaître les ARN aberrants et/ou les protéger de la dégradation afin de leur permettre d'être utilisés comme matrice par la protéine SGS2 (RdRP) pour synthétiser les duplex d'ARN, éventuellement en association avec la protéine SGS3;

- des protéines similaires aux protéines Dicer et Mut-7 identifiées chez la drosophile et chez *C. elegans* codant respectivement une RNaseIII (spécifique des ARN double brin) et une RNaseD (exonucléase 3'→5') pourraient ensuite participer à la dégradation des ARN duplex, à la formation des petits ARN de 25 nucléotides, et à la dégradation des ARNm dans un complexe de dégradation;

- la protéine MET1 pourrait être nécessaire au maintien de la PTGS au cours du développement de la plante en méthylant *de novo* les séquences du transgène homologues aux duplex d'ARN de façon à maintenir la structure de la chromatine responsable de la synthèse des ARN aberrants. En effet, il a été montré qu'un ARN double brin nucléaire induisait fortement la méthylation des séquences homologues du génome [33], suggérant un retour au noyau de l'information liée aux étapes cytoplasmiques de la PTGS.

La PTGS, un système de résistance générale aux virus

Depuis la découverte de la PTGS en 1990, de nombreux résultats expérimentaux ont mis en évidence des liens étroits entre PTGS et infection virale. Il est généralement admis que la PTGS reflète un mécanisme de résistance aux virus. Toutefois, les relations entre PTGS et virus sont complexes. En effet, nous montrons ci-dessous que, si les virus peuvent être des cibles de la PTGS, il peuvent également en être des inducteurs ou des inhibiteurs.

Les virus cibles de la PTGS

Il est possible de rendre une plante résistante à un virus en introduisant un transgène permettant d'exprimer constitutivement une partie du génome viral sous le contrôle d'un promoteur fort. La résistance peut être immédiate (on parle alors d'immunité), ou survenir après une phase préliminaire d'infection (on parle alors de récupération: *recovery*). L'analyse de plantes transgéniques exprimant des fragments d'un génome viral a montré une corrélation négative entre le niveau d'accumulation des ARN du transgène et la résistance. En effet, les plantes immunes n'accumulent pas les ARN du transgène bien qu'elles l'expriment dans le noyau. Dans les cas de *recovery*, les ARN du transgène sont accumulés avant infection puis disparaissent en même temps que la plante devient résistante. On peut noter qu'après *recovery*, une plante est complètement insensible à une deuxième infection, indiquant que l'immunité a été acquise. Les auteurs de ces travaux

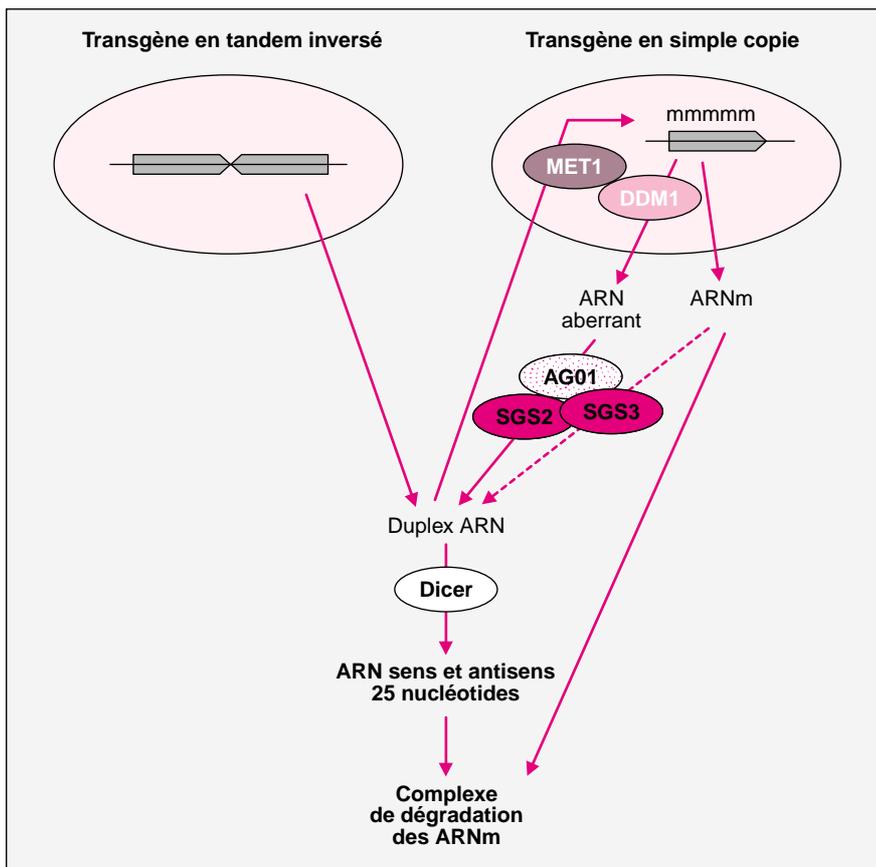


Figure 2. **Modèle proposé du phénomène de PTGS chez les végétaux.** Dans le cas où le transgène est en répétition inversée, un duplex d'ARN est transcrit. Ce duplex serait ensuite clivé par une RNase double-brin (homologue de la protéine Dicer de la drosophile) engendrant ainsi les petits fragments d'environ 25 nucléotides d'ARN sens et antisens. Ces ARN de 25 nucléotides pourraient ensuite guider la dégradation des ARNm homologues dans un complexe de dégradation. Lorsque le transgène est en copie unique, une forte transcription en présence de la protéine DDM1 pourrait induire une conformation de la chromatine au niveau du transgène, propice à la transcription d'ARN aberrants. La protéine AGO1, homologue du facteur eIF2C, pourrait reconnaître les ARN aberrants et/ou les protéger de la dégradation afin de leur permettre d'être utilisés comme matrice par la protéine SGS2 (RdRP), éventuellement aidée par la protéine SGS3, pour synthétiser des duplex d'ARN. En présence de la protéine MET1, ces duplex d'ARN (ou alternativement le produit de dégradation de ces duplex), après avoir été importés dans le noyau, pourraient participer à la méthylation de la séquence codante du transgène. Cette méthylation permettrait, en stabilisant la conformation de la chromatine propice à la synthèse d'ARN aberrants, l'entretien du système et le maintien de la PTGS.

ont émis l'hypothèse selon laquelle ce type de résistance pouvait être relayé par un mécanisme voisin de la PTGS [34]. Dans le modèle proposé, les plantes transgéniques immunes vis-à-vis l'infection virale portent un transgène inactivé par PTGS, indépendamment de la présence ou de l'absence du virus, alors que les plantes transgéniques résistantes par *recovery* portent un transgène dont l'inactivation par PTGS est induite lors de l'infection

virale. Dans ce dernier cas, la plante garde le «souvenir» de cette première infection, ce qui lui confère une immunité face au virus. Il est tentant de proposer alors que le signal qui confère à l'ensemble de la plante une immunité vis-à-vis de l'infection virale est de même nature que le signal systémique de PTGS mis en évidence dans les expériences de greffe [8].

La mise en évidence d'un mécanisme de type PTGS dans la résistance à

l'infection virale conduisit à suggérer que le rôle biologique de la PTGS était de lutter contre des infections virales [34]. Les ARN transcrits par certains locus transgéniques et les ARN de certains virus pourraient constituer des cibles privilégiées de la machinerie de PTGS lorsqu'ils participent à des duplex d'ARN. En effet, des duplex d'ARN peuvent être produits par certains locus transgéniques en tandem inversé ou après action de la RdRP sur des ARN aberrants (*voir plus haut*). De même, des duplex d'ARN apparaissent naturellement au cours de la réplication du génome viral. Certaines plantes sauvages récupèrent spontanément d'une infection virale et deviennent immunes vis-à-vis d'une surinfection par le même virus ou par un virus recombinant portant une partie de la séquence du premier virus infectant [35, 36]. Ces cas de *recovery* naturels apportent un faisceau d'arguments confortant l'hypothèse de l'implication de mécanismes semblables à la PTGS dans les interactions plantes-virus, et montrent que l'immunisation acquise par la plante est bien d'origine génétique et non physiologique.

La preuve que la machinerie cellulaire mise en jeu pour inactiver un transgène par PTGS est, au moins partiellement, identique à celle mise en jeu pour résister à certaines infections virales a été apportée dans notre laboratoire. Nous avons en effet montré que les mutants *sgs*, déficients pour l'inactivation des transgènes par PTGS, étaient hypersensibles à une infection par le virus CMV (*cucumber mosaic virus*) [21] (*figure 3*). Les protéines SGS sont donc nécessaires pour réduire la quantité d'ARN viral et limiter les symptômes d'infection.

Les virus inhibiteurs de la PTGS

Beaucoup de virus sont capables d'infecter efficacement les plantes alors que la plupart des espèces végétales possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à la PTGS. Les virus ont donc certainement développé des stratégies de contournement de la PTGS pour parvenir à infecter les plantes. Afin de tester cette hypothèse, plusieurs équipes ont infecté des plantes transgéniques portant des transgènes non viraux inactivés par PTGS avec différents virus, et ont constaté qu'un grand

nombre de virus étaient capables d'inhiber la PTGS de ces transgènes non homologues [37-40] (figure 4). Cependant, les modes d'inhibition de la PTGS diffèrent selon le virus considéré. En effet, certains virus inhibent la PTGS dans des tissus où elle était déjà installée ainsi que dans les tissus néoformés après l'infection, alors que d'autres virus n'inhibent que la mise en place de la PTGS dans des tissus néoformés après l'infection [39]. Plusieurs protéines virales capables d'inhiber la PTGS ont été identifiées. Leur expression dans une plante entraîne, à elle seule, l'inhibition de la PTGS [37, 39, 40]. Ces protéines n'ont en général aucune homologie de séquence entre elles. Pour la plupart, elles avaient été identifiées depuis longtemps comme des déterminants d'infectivité du virus mais leur fonction n'avait pas pu être précisée [39, 40]. Leur mode d'action sur la PTGS reste encore largement méconnue. Les seules données concernant la protéine HC-Pro des potyvirus dont l'action inhibitrice de la PTGS semble dériver de son interaction avec le gène et/ou le produit du gène *rgs-CaM* (voir plus haut). En effet, ce gène est induit lors d'une infection par un potyvirus, et des expériences de type « double-hybride » ont montré que son produit avait une affinité pour la protéine HC-Pro. Enfin, la surexpression du gène *rgs-CaM*, en l'absence du virus, inhibe la PTGS [28]. Ainsi, les potyvirus semblent inhiber la PTGS en activant une composante endogène antagoniste de la PTGS.

Ces résultats apportent donc de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes de résistance des plantes à l'infection virale. Jusqu'à présent, seuls des systèmes de résistance spécifique suivant la loi dite du « gène pour gène » avaient été identifiés. Dans ces systèmes, une plante résiste à un virus donné en reconnaissant une protéine particulière de l'agent pathogène et en entraînant une cascade d'événements conduisant à l'élimination de ce dernier. La limitation d'une infection virale par la PTGS montre qu'il existe un mécanisme de résistance non spécifique fondée cette fois sur la reconnaissance et la dégradation de l'ARN viral. Par ailleurs, l'inhibition de la PTGS par certains virus montre que, pour lutter contre ce mécanisme de résistance, de nombreux virus ont développé un système d'inhibition de la PTGS. Enfin, il

faut noter que certains virus sont capables d'infecter certaines plantes efficacement sans avoir aucun effet sur

la PTGS, suggérant que ces virus ont développé d'autres voies de contournement que l'inhibition de la PTGS [39].



Figure 3. **Hypersensibilité des mutants déficients en PTGS à l'infection par le virus CMV.** Les mutants *sgs2* d'*Arabidopsis*, déficients pour la PTGS, infectés par le CMV (A) montrent une hypersensibilité à l'infection par ce virus comparés à des plantes sauvages (C). Les mêmes plantes non infectées (B: mutants; D: sauvages) ne présentent aucune différence de croissance.



Figure 4. **Inhibition de la PTGS de la nitrite réductase par le virus CMV.** Des plantes de tabac portant un transgène de nitrite réductase infectées par le CMV (A) se développent normalement car le virus inhibe la PTGS induite par le transgène. Les mêmes plantes non infectées (B) sont incapables de se développer en raison de l'inactivation des gènes de nitrite réductase par PTGS.

Les virus inducteurs de la PTGS

Nous avons vu que les cas de résistance aux virus relayée par la PTGS (naturelle ou par l'intermédiaire d'un transgène) se produisaient souvent par *recovery*. Les résistances par *recovery* semblent indiquer que le mécanisme qui permet à la plante de se débarrasser du virus n'est pas préexistant mais est induit par l'infection. Dans les cas de *recovery* induits par un transgène d'origine virale, les ARN transcrits par le transgène sont dégradés après que l'infection par le virus ait induit la PTGS. Plusieurs équipes ont donc tenté de provoquer l'inactivation ciblée de gènes endogènes (ou de transgènes) en infectant une plante par un virus recombinant dans lequel avait été clonée une partie de la séquence codante de ces gènes [41, 42]. Une inactivation efficace a été observée. Ce système, appelé VIGS (*virus induced gene silencing*), constitue maintenant un outil performant pour des programmes d'étude globale de fonctionnement du génome. En effet, le clonage d'un ADNc codant pour une protéine de fonction inconnue dans un vecteur viral induisant le VIGS permet facilement d'inactiver le gène correspondant et d'apporter de précieuses informations sur la fonction de ce gène lorsque des mutants ne sont pas disponibles.

Nous avons vu qu'un même virus peut être tantôt une cible, tantôt un inducteur, et tantôt un inhibiteur de la PTGS. Ces résultats soulèvent plusieurs questions :

– comment les virus peuvent-ils déclencher le VIGS et comment échappent-ils à la dégradation séquence-spécifique déclenchée par le VIGS qui devrait théoriquement les éliminer alors qu'ils sont par ailleurs capables d'inhiber le VIGS ? Pour expliquer le VIGS, on peut supposer que les protéines virales inhibant la PTGS affectent des étapes qui ne sont pas nécessaires au VIGS. On peut par exemple imaginer que les virus inhibent les étapes d'amplification du phénomène qui permettent, à partir d'un événement rare initial (par exemple, la formation du premier duplex d'ARN) de dégrader l'ensemble des ARN homologues. Dans le cas du VIGS, la quantité d'ARN viral présent dans la cellule est tellement importante que le mécanisme d'amplification n'est sans doute pas nécessaire

pour que chaque ARN messager forme un duplex d'ARN (avec un ARN viral) et soit dégradé ;

– comment les virus peuvent-ils déclencher le *recovery* qui va les éliminer alors qu'ils sont par ailleurs capables d'inhiber la PTGS ? Pour expliquer le *recovery*, on peut supposer que, sous certaines conditions (en particulier en présence d'un transgène d'origine virale), la résistance par PTGS peut être induite dans une cellule avant que le virus ait eu le temps de se multiplier et de produire une quantité suffisante de protéine inhibitrice de la PTGS.

Conclusions

Les phénomènes épigénétiques sont encore relativement mal connus, tant au niveau des mécanismes mis en jeu qu'au niveau des fonctions biologiques qu'ils assument. L'inactivation transcriptionnelle ou TGS (phénomène essentiellement nucléaire et concernant seulement l'ADN et la chromatine) et l'inactivation post-transcriptionnelle ou PTGS (phénomène essentiellement cytoplasmique et concernant principalement les ARN) étaient jusqu'à présent considérées comme des événements exclusifs. Cependant, des résultats récents ont montré que certains éléments de la machinerie cellulaire (DDMI, MET1) contrôlaient les deux phénomènes. De plus, il est apparu que l'induction de la TGS, comme celle de la PTGS, pouvait faire intervenir des duplex d'ARN [1]. La plupart des organismes vivants peuvent induire la TGS et la PTGS. Même si les modes de déclenchement et de mise en place peuvent diverger sensiblement entre animaux, champignons et plantes, l'existence de la TGS et de la PTGS chez la plupart des eucaryotes indique que l'origine de ces mécanismes est ancienne. Cependant, l'évolution semble les avoir mis à profit pour assumer des rôles biologiques différents. En effet, la TGS participe au contrôle d'éléments transposables chez les plantes [43], alors que, chez *C. elegans*, le RNAi est impliqué dans le contrôle des transposons [26, 27] et que, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'inactivation des rétro-transposons semblent assurée par la machinerie d'inactivation post-transcriptionnelle [27]. De plus, chez les plantes, la PTGS est un mécanisme de résistance aux virus alors que, chez les autres orga-

nismes, aucune donnée expérimentale n'indique jusqu'à présent que les phénomènes d'inactivation post-transcriptionnelle interviennent dans la lutte contre les virus. Cependant, il est possible que les différences observées ne soient qu'apparentes et ne reflètent en fait que l'absence de données expérimentales. Il serait donc important, maintenant, d'étudier les possibles implications, d'une part de la PTGS dans l'inactivation des transposons et des rétro-transposons chez les végétaux et, d'autre part, du RNAi dans la lutte contre les virus chez les animaux ■

Remerciements

Nous remercions Mathilde Fagard pour la relecture du manuscrit.

* GLOSSAIRE *

Chlorose : jaunissement résultant d'un défaut de photosynthèse.

HDGS : homology-dependent gene silencing.

Mutants *ddm* : mutants dont la méthylation globale du génome est réduite.

Mutants *egs* : mutants dont la capacité de déclencher la PTGS est accentuée.

Mutants *sgs* : mutants affectés dans leur capacité de déclencher la PTGS.

PTGS : post-transcriptional gene silencing, inactivation post-transcriptionnelle d'un gène due à la dégradation spécifique de ses ARNm et des ARNm homologues.

Quelling : équivalent de la PTGS chez *Neurospora crassa*.

Recovery : manifestation d'une résistance à une infection virale après le développement initial de symptômes.

RNAi : RNA interference, inactivation post-transcriptionnelle d'un gène par injection d'un duplex d'ARN homologue à la séquence transcrite de ce gène.

TGS : transcriptional gene silencing, inactivation transcriptionnelle d'un gène due à une absence de transcription.

VIGS : virus induced gene silencing, inactivation post-transcriptionnelle d'un gène après infection par un virus recombinant portant une séquence homologue à la séquence transcrite de ce gène.

RÉFÉRENCES

1. Vaucheret H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 2001; 17: 29-36.
2. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279-89.
3. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990; 2: 291-9.
4. van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 1994; 6: 861-77.
5. Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser T, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 1996; 15: 3153-63.
6. Elmayan T, Vaucheret H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J* 1996; 9: 787-97.
7. Elmayan T, Balzergue S, Béon F, et al. *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 1998; 10: 1447-57.
8. Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H. Systemic acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 1998; 16: 4738-45.
9. Hamilton A, Baulcombe D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; 286: 950-2.
10. Palauqui JC, Elmayan T, Dorlhac de Borne F, Crété P, Charles C, Vaucheret H. Frequencies, timing, and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* 1996; 112: 1447-56.
11. Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 1998; 16: 651-9.
12. Baulcombe DC. RNA as a target and a initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 1996; 32: 79-88.
13. Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13959-64.
14. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.
15. Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 70-5.
16. Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 2000; 24: 180-3.
17. Metzloff M, O'Dell M, Cluster PD, Flavell RB. RNA-mediated degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. *Cell* 1997; 88: 845-54.
18. Palauqui JC, Vaucheret H. Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9675-80.
19. Morel JB, Mourrain P, Béclin C, Vaucheret H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2000; 10: 1591-4.
20. Dehio C, Schell J. Identification of plant genetic loci involved in a post-transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5538-42.
21. Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, et al. *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; 101: 533-42.
22. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; 101: 543-53.
23. Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999; 399: 166-9.
24. Cogoni C, Macino G. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 1999; 286: 2342-4.
25. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 2000; 404: 245.
26. Sharp PA, Zamore PD. RNA interference. *Science* 2000; 287: 2431-2.
27. Baulcombe DC. Unwinding RNA silencing. *Science* 2000; 290: 1108-9.
28. Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, et al. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000; 290: 142-4.
29. Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11650-4.
30. Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 2000; 43: 189-201.
31. Jeddelloh JA, Stokes TL, Richards EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* 1999; 22: 94-7.
32. Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19: 5194-201.
33. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; 76: 567-76.
34. Dougherty WG, Parks TD. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 399-405.
35. Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998; 279: 2113-5.
36. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; 276: 1558-60.
37. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13079-84.
38. Béclin C, Berthome R, Palauqui JC, Tepfer M, Vaucheret H. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 1998; 252: 313-7.
39. Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998; 17: 6739-46.
40. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe D. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 23: 14147-52.
41. Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grille LK. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1679-83.
42. Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998; 10: 937-46.
43. Steimer A, Amedeo P, Afsar K, Franz P, Scheid OM, Paszkowski J. Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; 12: 1165-78.

TIRÉS À PART

C. Béclin.

Summary

PTGS in plants, a virus resistance mechanism

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) in plants and quelling in fungi are transgene-induced silencing phenomena, resulting from the degradation of transgene RNAs and homologous endogenous RNAs. PTGS shows similarities with RNAi in animals, a phenomenon induced by injection of double-stranded RNA (dsRNA) or introduction of transgenes expressing dsRNA. First, PTGS and RNAi both involve dsRNA. Second, they can be dissected into three steps: localized initiation, propagation of a sequence-specific systemic signal, maintenance in silenced tissues. Finally, they both correlate with the accumulation of 25nt sense and anti-sense RNAs. Genetic dissection and cloning of genes regulating PTGS, quelling and RNAi confirmed the links between these three phenomena. Indeed, all three involve a putative RNA-dependent-RNA polymerase and a protein similar to the translation initiator factor eIF2C. However some differences can be noticed. In particular, PTGS in plants requires two genes, *SGS3* (encoding a protein of unknown function) and *MET1* (encoding a DNA-methyltransferase), which are not required for RNAi. Indeed, the genomes of *C. elegans* and *Drosophila* (two organisms undergoing RNAi) lack both methylation and orthologs of the *SGS3* gene). Several experiments revealed that PTGS is a general mechanism of virus resistance. In particular, we showed that *Arabidopsis* mutants impaired in PTGS are hypersensitive to infection by the virus CMV. However, many viruses have developed strategies to counteract PTGS and therefore succeed to infect plants. Because viruses may act as targets, inducers or inhibitors of PTGS, the success and the extent of virus infection therefore depends on the competition between plant PTGS defenses and virus counteracting effects.

13^e COURS ANNUEL DE LA SFI Centre de Congrès des Pensières, Annecy

Vendredi 9 - Mardi 13 novembre 2001

2001 : L'ODYSSÉE DE L'IMMUNOLOGIE

organisé par

la Société Française d'Immunologie (SFI)
avec le soutien de la Fondation MÉRIEUX
et la participation de l'Association des Enseignants
d'Immunologie des Universités de Langue Française
(ASSIM)

Objectif du Cours

- Le cours se déroule en immersion totale du vendredi après-midi au mardi midi. Il s'adresse aux enseignants d'immunologie qui peuvent y trouver une aide à la préparation de leurs cours propres, aux jeunes scientifiques qui peuvent y élargir la vue forcément focalisée qu'ils ont de l'immunologie, aux Chercheurs et Ingénieurs de laboratoires de recherche en immunologie ou dans des domaines interactifs avec cette discipline.
- Les huit conférenciers, qui assistent à l'intégralité du cours, donnent deux séminaires d'une heure et demie chacun. Cette organisation facilite les échanges tant entre les étudiants et les conférenciers, qu'entre les étudiants entre eux, que ce soit de façon formelle au cours d'une table ronde le dimanche après-midi, ou le soir, ou informels pendant les repas et les pauses.
- La SFI étant reconnue comme formateur agréé sous le n° 11.75.28.994.75, le cours peut être pris en charge par divers organismes (Inserm, Cnrs, Inra, etc.). Les frais d'inscription à deux niveaux ont été étudiés pour faciliter la venue de titulaires, pouvant être pris en charge par la formation continue, et d'autres personnes qui n'en sont pas bénéficiaires.

Inscriptions

Frais d'inscription comprenant le cours, le document, les repas et l'hébergement :

- | | | |
|-------------------|-----------|-----------------|
| • titulaire : | 680 euros | 4 460,51 francs |
| • non-titulaire : | 340 euros | 2 230,25 francs |

Date limite de pré-inscription : 1^{er} octobre 2001

Réponse du comité de sélection : 10 octobre 2001

Fiche de pré-inscription à demander, à envoyer au secrétariat de la SFI : Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15. Tél. : 01.45.68.81.64 – Fax : 01.45.67.46.98