

démontré, chez la souris, qu'il favorise l'expression de l'allèle paternel en réduisant la transcription de l'antisens par un mécanisme distinct de la méthylation du centre de contrôle et qui reste à découvrir. L'identification du mécanisme d'action du Topo via cette activation de l'expression de l'allèle paternel du gène *UBE3A* pourrait permettre le développement de nouvelles approches pharmacologiques pour traiter les patients atteints du syndrome d'Angelman.

De fait, de nombreuses interrogations persistent avant que l'on puisse affirmer que ces résultats obtenus chez la souris peuvent s'appliquer à des humains. Par exemple, les effets de cette molécule sur l'expression du gène *Ube3a* sont-ils stables à long terme chez la souris ? Quels seraient les effets du Topo sur l'expression clinique du syndrome d'Angelman chez l'animal ? Quelles seraient les doses nécessaires ?

Y aurait-il des effets secondaires ? Le traitement serait-il sûr et efficace chez des humains ? À quel type de patient l'administrer ? Ce n'est que lorsqu'une démarche scientifique aura permis de clarifier ces aspects que l'on pourra envisager dans quelle mesure des molécules comme le Topo seraient à même de soulager les symptômes des individus atteints du syndrome d'Angelman.

Ce sont de nouvelles questions qui soulèvent l'enthousiasme des équipes qui y travaillent tout en n'oubliant pas que l'éthique de la science médicale impose de suivre des chemins balisés et progressifs qui ne mènent aux essais cliniques qu'après obtention des réponses à toutes les questions préliminaires. ♦

A new Topo to targeted management of Angelman syndrome?

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Dan B. *Angelman syndrome*. London : Mac Keith Press, Wiley-Blackwell, 2008 : 256 p.
2. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. *UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome*. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 70-3.
3. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, et al. *De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome*. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 74-7.
4. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, et al. *The Angelman syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc*. *Cell* 2010 ; 140 : 704-16.
5. Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, et al. *Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome*. *J Neurosci* 2003 ; 23 : 2634-44.
6. Cheron G, Servais L, Wagstaff J, Dan B. *Fast cerebellar oscillation associated with ataxia in a mouse model of Angelman syndrome*. *Neuroscience* 2005 ; 130 : 631-7.
7. Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, et al. *An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript*. *Nat Genet* 1998 ; 19 : 15-6.
8. Bird LM, Tan WH, Bacino CA, et al. *A therapeutic trial of pro-methylation dietary supplements in Angelman syndrome*. *Am J Med Genet* 2011 ; 155A : 2956-63.
9. Huang HS, Allen JA, Mabb AM, et al. *Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons*. *Nature* 2011 ; 481 : 185-9.

NOUVELLE

Transmission multigénérationnelle de l'interférence à l'ARN chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

Tony BÉLICARD, Marie-Anne FÉLIX

Institut de biologie de l'École normale supérieure (ENS), CNRS-Inserm-ENS, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.

felix@biologie.ens.fr

► Chez de nombreux organismes, l'introduction artificielle d'un fragment d'ARN double brin (ARNdb) correspondant à la séquence d'un gène inactive spécifiquement l'expression de ce gène. Ce phénomène d'interférence à l'ARN (ARNi) a été mis en évidence chez le nématode *C. elegans* [1], un petit ver d'un millimètre qui est devenu un organisme modèle de laboratoire. L'ARNi est devenu un outil pratique d'inactivation des gènes, et cette découverte a valu le prix Nobel de médecine à Andy Fire et Craig Mello

en 2006. Des résultats récents montrent que la réponse ARNi peut être transmise de génération en génération en affectant l'état des histones et la régulation transcriptionnelle du gène. Le rôle physiologique de cette transmission héréditaire pourrait-il être la défense antivirale ?

Inactivation post-transcriptionnelle... mais aussi transcriptionnelle

Le mécanisme de l'ARNi a été amplement étudié depuis 15 ans [2]. Chez *C. elegans*, l'injection ou l'ingestion d'un ARNdb

peut déclencher la réponse d'interférence. La ribonucléase Dicer/DCR-1 clive dans le cytoplasme l'ARNdb en fragments de 21 nucléotides, nommés siARN (si pour *small interfering*) (Figure 1). Ces siARN-1 recrutent et guident la protéine Argonaute RDE-1 vers une autre copie de l'ARN messager complémentaire (ARNm) qui sert de matrice à la synthèse de siARN 2° antisens par une ARN polymérase dépendante de l'ARN. Ces siARN 2° amplifiés lient alors d'autres protéines Argonaute, et ces complexes induisent la

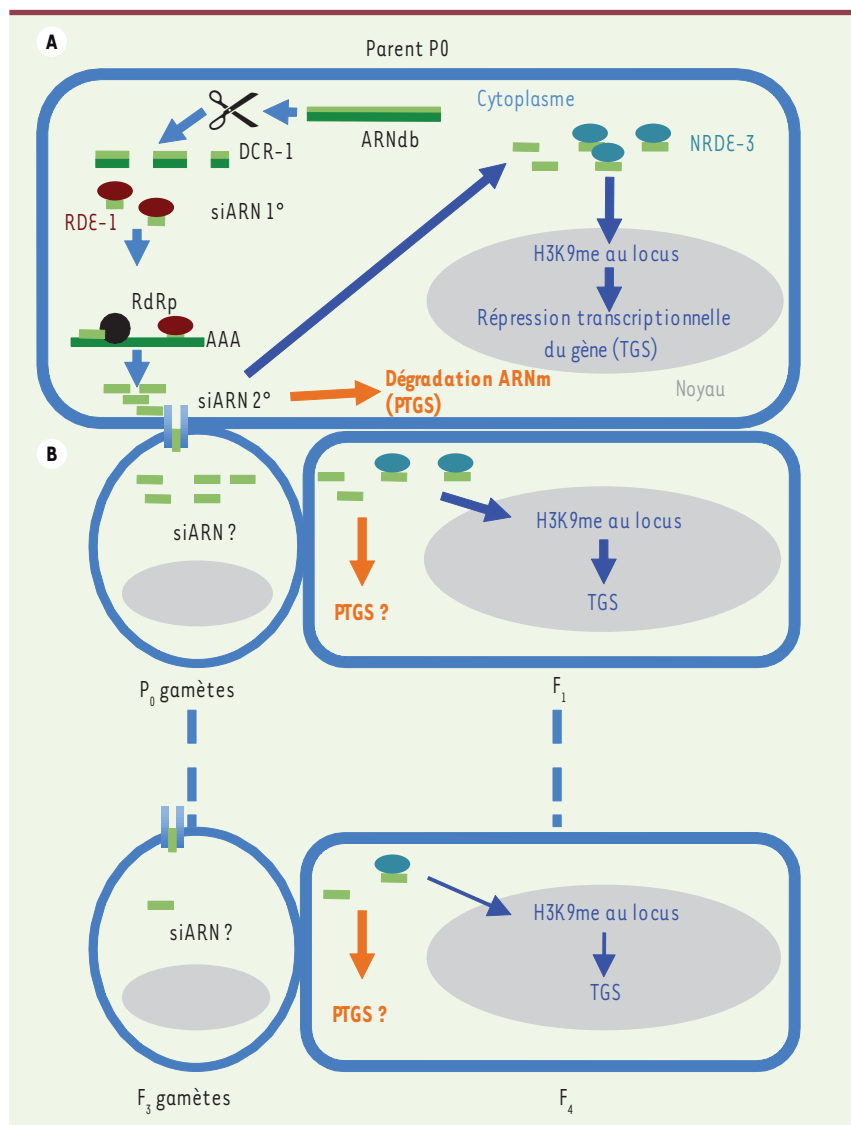


Figure 1. Mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels de l'extinction de gènes par l'ARN double-brin et transmission multigénérationnelle. **A.** Dans le parent P0 exposé à des ARNdb, deux mécanismes de répression de l'expression du gène correspondant peuvent être déclenchés. L'ARNdb (en vert) est fragmenté par l'enzyme DCR-1. Les petits siARN 1° produits (extrémité 5' monophosphate) sont pris en charge par l'Argonaute RDE-1. Ce complexe s'hybride à son ARNm complémentaire et produit des siARN antisens dits 2° (extrémité 5' triphosphate). Ces derniers vont, soit participer directement au clivage des ARNm correspondants (voie PTGS ou *post-transcriptional gene silencing*, en orange), soit être pris en charge par l'Argonaute NRDE-3. Le complexe siARN 2°/NRDE-3 entre dans le noyau et réprime la transcription du gène correspondant (voie TGS ou *transcriptional gene silencing*, en bleu). **B.** Transmission de l'extinction du gène dans les générations suivantes (F₁, etc.). Des siARN (vraisemblablement 1°) semblent être transmis dans les gamètes et, même en absence d'ARNdb exogène dans la descendance, permettent l'extinction des gènes ciblés via la méthylation de l'ADN. La quantité de siARN transmis décroît au fil des générations.

dégradation des ARNm correspondants. Ceci conduit à l'extinction post-transcriptionnelle (PTGS pour *post-transcriptional gene silencing*) du gène.

Un second mécanisme d'action des siARN 2° a été mis en évidence chez *C. elegans* par le laboratoire de Scott Kennedy. Les siARN 2° se lient à la

protéine Argonaute NRDE-3, et le complexe entre dans le noyau. L'extinction du gène correspondant se fait alors au niveau de la transcription (TGS pour *transcriptional gene silencing*) (Figure 1). Les gènes impliqués dans ce phénomène ont été identifiés par un crible génétique et appelés *nrde* (*nuclear-RNAi deficient*).

Extinction transgénérationnelle de certains gènes à partir d'un ARNdb spécifique

Chez *C. elegans*, l'ARNi peut, dans certains cas, persister pendant plusieurs générations, mimant les effets transgénérationnels de l'extinction de gènes connus chez certains champignons et plantes. Ainsi, chez *C. elegans*, l'extinction d'un transgène exprimant la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) peut être transmise jusqu'à 20 générations après l'ingestion d'ARNdb spécifique de la GFP [3]. Cette transmission de l'extinction fonctionne pour certains gènes seulement (13/171 gènes testés sont ainsi éteints sur plusieurs générations) [3-5], sans que l'on comprenne pour l'instant ce qui les caractérise.

Une diminution de la quantité d'ARNdb injectée réduit la durée de l'extinction du gène, suggérant que la transmission de l'effet ARNi est diluée au fil des générations [5]. La même étude du laboratoire d'Andrew Fire révèle que les deux types de gamètes, mâle et femelle, sont capables de transmettre ces facteurs, mais que les spermatozoïdes le font plus efficacement.

Deux mécanismes de transmission transgénérationnelle

La transmission de l'extinction ARNi ne requiert pas que la descendance puisse elle-même produire des siRNA 1°. En effet, cette transmission se fait normalement chez un descendant incapable de produire des siARN 1° (mutant *rde-1* ou *rde-4*) [4]. En revanche, les gènes nécessaires à l'amplification des siARN 2°, comme *mut-7* ou *rde-2*,

doivent, eux, être fonctionnels dans la descendance [4], comme doivent l'être aussi les gènes *nrde-2*, *nrde-3* et *nrde-4* nécessaires à la voie de régulation transcriptionnelle en aval des siARN 2° [6]. La transmission transgénérationnelle requiert donc, à chaque génération, la formation de siARN 2° et, en aval, une voie de répression transcriptionnelle intacte (Figure 1).

La répression transcriptionnelle par les siARN 2° semble passer par des modifications d'histones. Les histones sont des protéines de la chromatine qui régulent le degré de condensation et l'accessibilité de cette dernière pour que s'enclenche la transcription. En effet, la voie nucléaire des siARN active la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me) [6], une modification qui inhibe localement la transcription. De plus, la transmission de l'extinction d'expression génique est abolie chez des mutants affectant la structure chromatinienne [3].

Gu *et al.* [7], du laboratoire d'Andrew Fire, ont récemment réussi à suivre la quantité de siARN 2° spécifiques et le taux de méthylation de H3K9 au locus correspondant chez un ver adulte ayant absorbé des ARNdb spécifiques et dans sa descendance pendant quatre générations. Dans la génération parentale (P0), la synthèse des siARN spécifiques est d'abord détectée, puis une marque H3K9me au niveau du gène ciblé est observée. Les siARN 2° et la méthylation sont ensuite détectés chez les descendants et ce jusqu'à trois générations dans cette étude, mais avec un marquage d'intensité décroissante au fil des générations [7].

Quel peut être le facteur transmis par les gamètes qui permet l'hérédité de l'extinction transcriptionnelle ? Les modifications d'histones sont transmissibles lors des divisions cellulaires, mais elles sont généralement « réinitialisées » dans la lignée germinale chez *C. elegans*. De plus, l'extinction transcriptionnelle peut aussi s'appliquer à une copie du gène

nouvellement introduite par croisement, et l'action des siARN 2° sur la méthylation des histones semble devoir être répétée à chaque génération. La transmission de siARN *via* les gamètes pourrait permettre une persistance et une réamplification de l'extinction transcriptionnelle de certains gènes au fil des générations. Pour l'instant, il n'est pas clair s'il s'agit de siARN 2° ou 1° (voir plus loin).

L'enjeu évolutif de la transmission de l'ARNi serait-il l'immunisation de la descendance contre des pathogènes naturels ?

En principe, la transmission transgénérationnelle du statut de l'expression des gènes permet à un parent de transmettre à sa descendance les conséquences qu'ont imprimées à son organisme les influences de l'environnement (effet « lamarckien »). Ceci peut concerner par exemple la défense antivirale. En effet, chez *C. elegans* comme chez les plantes et les insectes, la voie d'ARNi joue un rôle dans la défense antivirale - de nombreux virus ayant un génome de type ARNdb.

Le virus d'Orsay - découvert récemment - est le premier virus naturel de *C. elegans* [8]. Son génome s'apparente à celui des nodavirus et est composé de deux segments d'ARN simple brin positif (ARN1 et ARN2). L'ARN1 code pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP) qui synthétise le brin complémentaire des ARN viraux et, par conséquent, crée des ARNdb. Ceux-ci déclenchent alors une réponse siARN contre le génome viral. Les mutants *C. elegans* des gènes impliqués dans la réponse siARN sont plus sensibles au virus que le génotype sauvage de référence [8]. La réponse siARN est donc requise pour la défense antivirale chez *C. elegans*.

La réponse à un virus peut-elle se transmettre d'une génération à l'autre, et ainsi « immuniser » plusieurs générations ? Chez *C. elegans*, nous n'avons pas encore la réponse avec un virus

infectieux comme le virus d'Orsay, mais un système artificiel a testé cette hypothèse.

Un système transgénique artificiel reconstituant la réplication du *Flock house virus* (FHV), un nodavirus d'arthropode qui n'infecte pas naturellement *C. elegans*, a été mis au point il y a quelques années [9]. Le génome du virus FHV est composé de deux ARN dont l'un code pour une RdRP et pour la protéine B2 qui inhibe la réponse ARNi de l'hôte. En remplaçant cette protéine B2 par la GFP et en construisant un ver transgénique dans lequel les séquences ADN correspondant à RdRP et B2 sont sous le contrôle d'un promoteur inducible par un choc thermique, la réplication de l'ARN1 viral dans le ver (qui est assurée ensuite de façon autonome par la RdRP) et la réponse d'extinction peuvent être reconstituées et suivies en mesurant l'expression ou l'extinction de la GFP [9]. Rechavi *et al.* [10] ont récemment étudié la transmissibilité intergénérationnelle de petits ARN antiviraux dérivés de l'expression d'un tel transgène. Comme c'est le cas pour un gène endogène ou la GFP (voir plus haut), l'extinction des ARN viraux peut se transmettre en absence de la machinerie de formation des siARN 1° chez les descendants (mutant *rde-1*), et peut se transmettre à une nouvelle copie du gène testé introduite par croisement. Cependant, cette réponse requiert à chaque génération l'amplification de siARN 2° - elle est abolie dans le mutant *rrf-1* affectant une RdRP du ver. Des siARN 1° correspondant aux séquences virales peuvent être détectés sur plusieurs générations, quoique en très petit nombre dès la troisième génération. Ceci suggère donc que la transmission peut s'effectuer *via* les siARN 1°, qui pourraient enclencher l'amplification *de novo* de siARN 2° à chaque génération. Pour ce qui est de la portée de cette étude sur la transmission d'une défense antivirale, on peut regretter que les séquences virales y soient portées par un transgène artificiel. En effet,



il est possible que l'interférence agisse ici exclusivement au niveau transcriptionnel. Ce ne peut pas être le cas avec un virus relativement proche, tel que celui d'Orsay, dont le génome n'existe pas sous une forme ADN.

En conclusion

L'extinction d'un gène par l'ARNdb correspondant peut se transmettre au fil des générations chez des animaux, comme chez les plantes et les champignons. Chez *C. elegans*, elle semble utiliser l'amplification de petits ARN spécifiques et la répression transcriptionnelle à chaque génération. L'impact de ce processus de transmission sur l'adaptation phénotypique des organismes en milieu naturel reste cependant à démontrer. Il est possible que la cible principale de cette extinction multigénérationnelle

soit les transposons insérés dans le génome. ♦

Multigenerational transmission of RNA interference in the nematode *Caenorhabditis elegans*

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

L'équipe est financée par le CNRS, l'ENS, l'Inserm, et pour la recherche sur les virus, la subvention de l'ANR11 BSV3 01301. Nous remercions Valérie Robert (ENS Lyon) pour ses commentaires.

RÉFÉRENCES

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
2. Fischer SEJ. Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 ; 42 : 1306-15.
3. Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, et al. Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature* 2006 ; 442 : 882.
4. Grishok A, Tabara H, Mello CC. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 2000 ; 287 : 2494-7.
5. Alcazar RM, Lin R, Fire AZ. Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2008 ; 180 : 1275-88.
6. Burton NO, Burkhart KB, Kennedy S. Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 19683-8.
7. Gu SG, Pak J, Guang S, et al. Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 157-64.
8. Félix M-A, Ashe A, Piffaretti J, et al. Natural and experimental infection of *Caenorhabditis* nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol* 2011 ; 9 : e1000586.
9. Lu R, Maduro M, Li F, et al. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005 ; 436 : 1040-3.
10. Rechavi O, Minevich G, Hobert O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell* 2011 ; 147 : 1248-56.

NOUVELLE



Positionnement du noyau dans les muscles
Nouvel acteur de la fonction musculaire
 Vincent Gache¹, Bruno Cadot¹, Edgar R. Gomes^{1,2}

Maturation des fibres du muscle squelettique et positionnement des noyaux

Les fibres des muscles squelettiques sont les principales cellules des vertébrés spécialisées dans la contraction, et sont responsables de tous les mouvements volontaires de l'organisme. Chaque fibre composant le muscle squelettique est un syncytium issu de la fusion de nombreuses cellules spécialisées : les myoblastes. Ces cellules, dont le potentiel prolifératif est élevé, ont la capacité de sortir du cycle cellulaire au début de la différenciation en expri-

mant de manière coordonnée les protéines spécifiques du muscle. Les myoblastes deviennent alors des myocytes, cellules spécialisées ayant acquis la particularité de pouvoir fusionner entre elles et de conduire à la formation de myotubes contenant plusieurs noyaux. Ces myotubes sont caractérisés par un positionnement central des noyaux qu'ils contiennent. Au cours de la maturation des myotubes, des unités contractiles appelées sarcomères vont se former par l'association précise de réseaux d'actines et de moteurs moléculaires, les myosines, permettant la contraction des fibres musculaires. Ces myotubes matures deviennent des myofibres et localisent les noyaux à la

¹UMR S 787 Inserm, université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 75634 Paris, France ;
²Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, institut de myologie, 105, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France.
edgar.gomes@upmc.fr

V. Gache et B. Cadot ont contribué équitablement à ce travail.

périphérie, près de la membrane. Ces myofibres sont les briques élémentaires du muscle [1, 2].

In vivo, tandis que dans les fibres matures les noyaux se localisent à la périphérie, ils sont alignés au centre de la fibre régénérée (Figure 1A, B) [3]. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons reproduit en laboratoire les premières étapes de la formation des fibres musculaires, et nous avons suivi les déplacements des noyaux au cours du temps. Nous avons pu observer qu'à la suite de la fusion d'un myocyte avec un myotube, le noyau du myocyte migre rapidement vers le centre du myotube. Par la suite, ces noyaux s'alignent le long du syncytium (Figure 1C). Ces observations nous ont

Photo : myotube formé *in vitro* après 5 jours de différenciation (microtubules en vert, noyaux en rouge) (© V. Gache, UMR S 787 Inserm).