

ARN interférence dans les cellules de mammifères

Vincent Brondani, Fabrice Kolb, Éric Billy

> Le dosage de l'expression des gènes est essentiel au bon fonctionnement cellulaire ainsi qu'au développement et au maintien des organismes pluricellulaires. De fait, des mécanismes biologiques permettent d'activer ou de réprimer l'ex-

pression des gènes sans affecter l'intégrité du support de l'information génétique. Au cours des dernières années, les biologistes se sont notamment intéressés aux phénomènes

Friedrich Miescher
Institut for Biomedical
Research,
Novartis Research
Foundation,
66, Maulbeerstrasse, Bâle,
CH-4058, Suisse.
Eric.Billy@fmi.ch

épigénétiques aboutissant à la répression de l'expression d'un gène. Ces régulations négatives, qui affectent aussi bien la transcription (TGS : inhibition épigénétique de la transcription) que les processus subséquents de l'expression des gènes (stabilité des ARN messagers, PTGS : inhibition épigénétique post-transcriptionnelle), sont communes à tous les eucaryotes [1]. Parmi les approches qui permettent d'étudier la fonction propre-

ment dite d'un gène, l'une d'entre elles consiste à supprimer l'expression de ce dernier, dans des cellules ou dans un organisme. De nouvelles techniques, comme l'interférence par ARN (ARNi [2]), fondées sur l'utilisation d'ARN double brin (ARNdb), sont en voie de développement.

La réaction ARNi détourne des enzymes impliquées dans le métabolisme d'ARNdb produits par les virus et les transposons. En effet, ces ARNdb de grande taille induisent des mécanismes cellulaires antiviraux ou des phénomènes de régulation de la transposition (Figure 1A). La réaction cellulaire met en jeu au niveau nucléaire des enzymes (ADAR, adénosine désaminase) capables de désaminer en inosine les adénines de l'ARNdb [3]. Ces modifications induisent la déstructuration des ARNdb et la séparation des deux brins d'ARN,

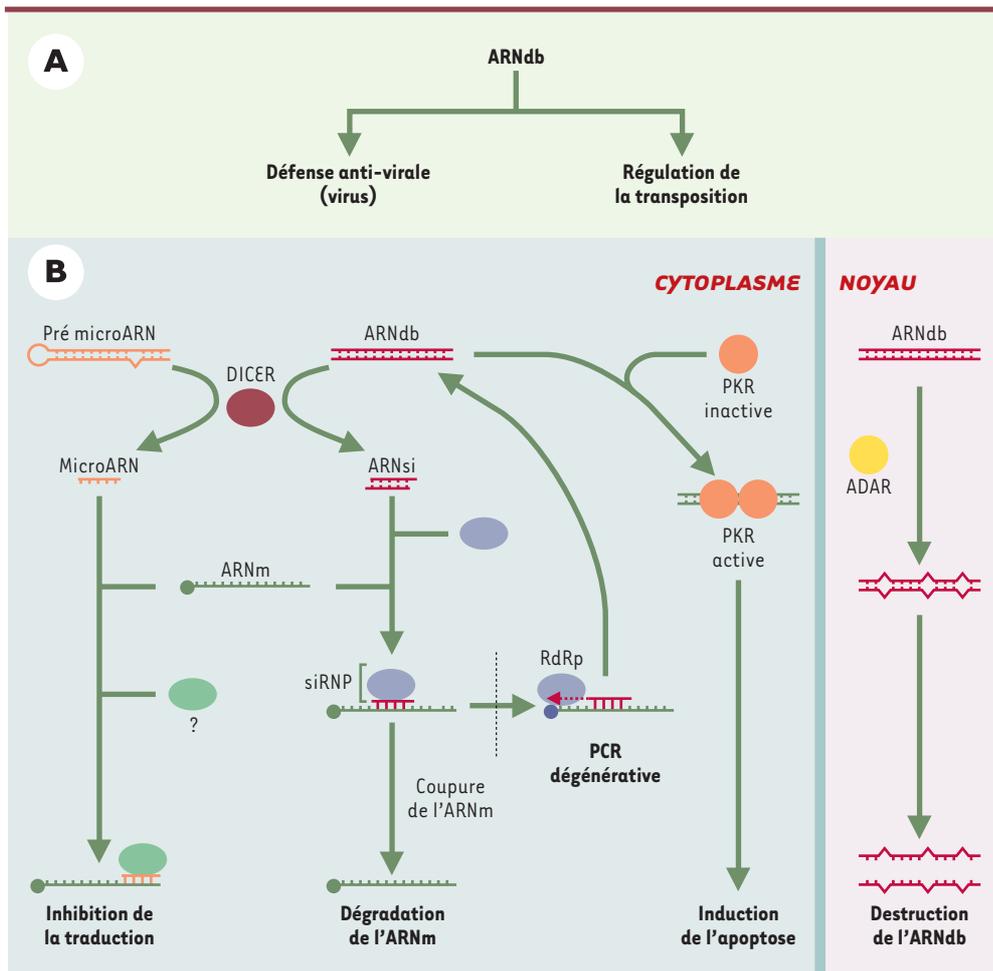


Figure 1. A. ARN double brin (ARNdb) cellulaires dans les cellules mammifères. B. Métabolisme des ARNdb et microARN : modèles de la réaction d'ARN interférence (ARNi). ADAR : adénosine désaminase ; PKR : protéine kinase ARN dépendante ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante ; ARNsi : petit ARN interférent ; siRNP : complexe ribonucléoprotéique impliquant les ARNsi ; ARNm : ARN messager.

conduisant à leur dégradation par des ribonucléases (Figure 1B). D'autre part, l'introduction d'un long ARNdb dans le cytoplasme active la production d'interféron, ainsi qu'une protéine kinase ARN dépendante (PKR). PKR est activée par dimérisation en présence de longs ARNdb, et autophosphorylation. PKR activée réprime la traduction du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . De plus, l'ARNdb induit la dégradation des ARN cellulaires en stimulant la ribonucléase L (RNaseL). Finalement, l'activation de la PKR, en conjonction avec la voie des interférons, induit l'apoptose cellulaire (Figure 1B) [3]. Ce mécanisme est déficient dans le cas des cellules embryonnaires telles que les cellules souches et les embryotérorcarcinomes. Dans ces dernières, c'est une autre protéine, appelée Dicer, qui est fortement exprimée [4]. Dicer est une enzyme comportant plusieurs domaines dont deux motifs ribonucléase III catalysant la coupure des longs ARNdb en petits fragments de 21 à 23 nucléotides appelés petits ARN interférents (ARNsi) [5]. Cette enzyme est importante au cours du développement embryonnaire puisqu'elle est impliquée dans la maturation des microARN nécessaires à la transition entre les stades larvaires chez *C. elegans* [6]. Ces deux formes d'ARN, ARNsi et microARN, représentent des signaux moléculaires essentiels lors des phénomènes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Deux processus biologiques distincts découlent de l'activité de ces deux formes de petits ARN (Figure 1B). Le mécanisme biologique d'action des microARN, actuellement très mal caractérisé, impliquerait d'autres facteurs pro-

téiques dont l'association permettrait spécifiquement l'inhibition de la traduction de gènes cibles [7]. L'ARNi, processus beaucoup mieux décrypté, présente la particularité d'agir par l'intermédiaire de voies de signalisation différentes en fonction des organismes. Chez la drosophile, l'ARNi nécessite la formation d'un complexe (siRNP) entre l'ARNsi et des protéines. Le complexe siRNP catalyse la réaction de clivage de l'ARN cible correspondant à la séquence complémentaire à l'ARNsi. La conséquence de cette coupure est la déstabilisation et la dégradation de l'ARN cible. Dans le cas d'un ARN messager (ARNm), le gène correspondant est réduit au silence. Dans d'autres organismes, tel *C. elegans*, une enzyme est capable de catalyser la synthèse d'un brin ARN à partir d'une matrice ARN. Cette ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) [8] utilise comme amorce l'un des brins de l'ARNsi. Le résultat de cette réaction est la formation d'un ARNdb. Ce dernier est alors utilisé comme substrat par Dicer. Ce modèle dit de « PCR dégénérative » aboutit à une amplification du signal ARNsi. L'étude de ces phénomènes biologiques et de ces mécanismes enzymatiques a

permis de développer différentes stratégies pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène par ARNi dans des cellules mammifères en culture (Figure 2A). D'une part, dans les cellules différenciées, il existe un système permettant de passer outre les mécanismes d'induction de l'apoptose cellulaire décrits précédemment en apportant un ARNdb de petite taille. Ainsi, l'introduction d'ARNsi est suffisante pour que la réaction de clivage de l'ARN cible se produise de façon efficace [9]. D'autre part, une interférence ARNi à partir d'un long ARNdb peut être réalisée *in vitro* dans des cellules souches embryonnaires ou d'embryotérorcarcinomes (exemple de gènes inactivés, eGFP, intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$) [4]. Les récentes études décrivant les effets des microARN, et une connaissance plus approfondie des mécanismes d'action de ces derniers, permettront peut-être de développer d'autres stratégies. L'utilisation d'ARN artificiel pourrait permettre de cibler l'expression d'un gène par inhibition de la traduction (Figure 2B). Par ailleurs, les plantes disposent d'un mécanisme qui permettrait de catalyser une réaction ARNdb

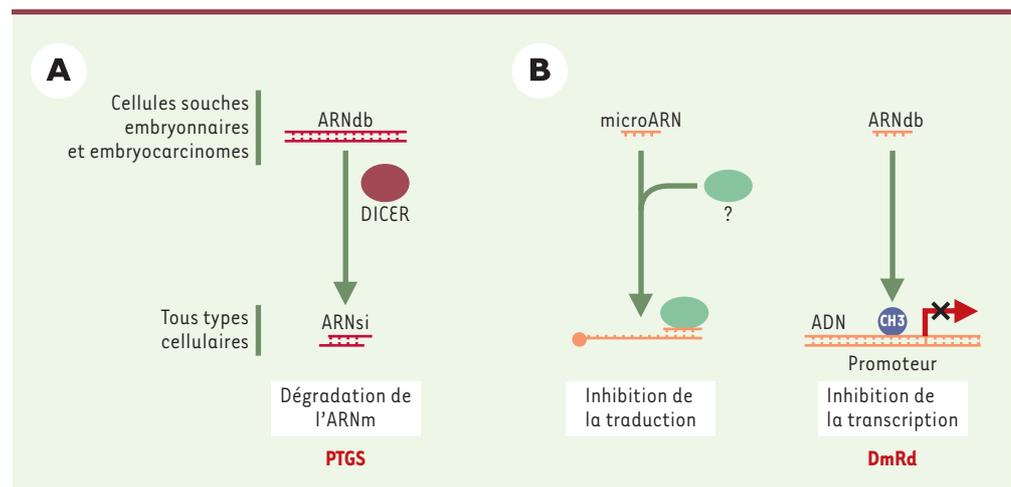


Figure 2. A. Stratégies d'introduction de la réaction ARNi dans un système utilisant des cellules de mammifères. B. Voie potentielle d'inhibition artificielle de l'expression de gènes dans les cellules de mammifères (méthylation ARN dépendante). ARNdb : ARN double brin ; ARNsi : petit ARN interférent ; DmRd : réaction ARNdb dépendante de la méthylation ; PTGS : *post-transcriptional genetic silencing*.



dépendante de la méthylation de l'ADN (DmRd) [10]. La méthylation d'une séquence promotrice implique généralement une inhibition de la transcription d'un gène. On pourrait donc envisager de réprimer l'expression d'un gène, par méthylation de ces séquences régulatrices, en utilisant comme support signalétique un ARNdb spécifique d'une séquence donnée. ♦

RNA interference in mammalian cells

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur W. Filipowicz et le Docteur J.P. Jost pour leurs conseils et la lecture critique de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ. The rest is silence. *RNA* 2001 ; 7 : 1509-21.
- 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.
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001 ; 14 : 778-809.
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell Lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 14428-33
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000 ; 101 : 25-33.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001 ; 294 : 853-8.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000 ; 403 : 901-6.
- Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 2001 ; 107 : 415-8.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 ; 411 : 494-8
- 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.

NOUVELLE

« Le piégeage de gènes » : un outil efficace de la génomique fonctionnelle

Sophie Gomez, Patrice Dubreuil, Sophie Lopez

Inserm U.119,
27 boulevard Leï Roure,
13009 Marseille, France.

> Divers stimulus relevant de mécanismes physiologiques fondamentaux comme la survie, la prolifération, la différenciation cellulaire ou le développement embryonnaire, entraînent la modulation de nombreux gènes au sein des cellules concernées. Dans le but d'identifier les gènes-clé de ces phénomènes, des outils permettant leur analyse à grande échelle ont été développés, qui se fondent sur l'isolement de transcrits dont l'expression varie selon que la cellule est ou n'est pas stimulée. Au vu du nombre restreint de gènes dont la fonction est identifiée, des stratégies d'analyse fonctionnelle du génome deviennent nécessaires.

Une de ces approches, « le piégeage de gènes », permet de révéler des locus

dont la transcription est activée lors d'une stimulation donnée, indépendamment de leur régulation post-transcriptionnelle. Cette technique offre l'avantage de coupler l'étude de la modulation d'un transcrit et la conséquence fonctionnelle de cette variation, elle-même directement liée au stimulus appliqué. Ce couplage est le fondement même de la technique du « piégeage de gènes ». Le principe (Figure 1) est fondé sur l'insertion aléatoire, dans le génome cellulaire, d'un vecteur plasmidique ou rétroviral dépourvu de promoteur propre, et contenant un gène révélateur immédiatement précédé d'un site accepteur d'épissage. Lorsque l'insertion survient dans un locus « actif », en présence du

stimulus étudié, un transcrit de fusion composé d'une partie 5' du gène « piégé » et du gène révélateur, s'exprime sous le contrôle du promoteur du gène « piégé ». L'analyse de la modulation de l'expression de ce gène de fusion révèle ainsi celle du gène piégé dont l'identification est accessible par 5'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Si l'insertion est aléatoire, l'expression de la protéine « révélatrice », elle, sera d'autant plus efficace que le vecteur est inséré en 5' du gène. En effet, la protéine révélatrice peut être traduite à partir de l'ATG du gène révélateur. Pour que celui-ci fonctionne en dehors de l'ATG de l'exon « piégé », les intégrations doivent prendre place avant l'exon codant du gène « piégé »,