

C. elegans, du génome à l'inactivation systématique par interférence par ARN

Il y a deux ans, les équipes américaines de Fire et de Mello ont publié dans *Nature* [1] la première description d'un phénomène appelé « RNAi » pour interférence par ARN, en montrant qu'un ARN double-brin (ARNds) peut spécifiquement abolir l'expression du gène correspondant chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Depuis, il a été montré que l'interférence par ARN se produit chez d'autres espèces, incluant les vertébrés ([2] et *m/s* 2000, n° 8-9, p. 993). Il correspond aussi à ce que l'on appelle la co-suppression, observée chez les plantes et le « quelling » mis en évidence chez les champignons [3]. Ces effets reflètent un mécanisme intervenant au niveau post-transcriptionnel, appelé *post-transcriptional gene silencing* (PTGS), qui pourrait être impliqué dans des défenses cellulaires contre des infections virales ou la modulation de l'activité de transposon [4, 5]. Les bases moléculaires de l'interférence par ARN ne sont toujours pas claires, mais sont actuellement l'objet d'études très détaillées [6].

Deux ans seulement après la mise en évidence de l'interférence par ARN chez *C. elegans*, plusieurs équipes présentent maintenant des résultats d'études systématiques sur l'ensemble des gènes du nématode [7, 8]. Le séquençage du génome de ce ver a permis de prédire plus de 19 000 gènes codant pour une protéine*, dont 10 000 sont associés à un ADNc dans des banques existantes. Le nombre des gènes exprimés pendant la vie du ver dans les conditions de laboratoire a été également déterminé à près de 10 000 par une étude globale d'expression des gènes faite à l'aide de puces à ADN [9]. Trois projets indépendants d'inactivation systématique des gènes sont fondés sur

trois techniques différentes d'introduction de l'ARN double-brin. De façon étonnante, chez le nématode, l'ARN double-brin peut en effet agir à distance du site d'introduction grâce à un mécanisme de transport à travers l'organisme. Les vers peuvent soit être injectés avec les ARN (le plus souvent dans la gonade) [1], soit être trempés dans une solution qui contient ces ARN [10], soit encore simplement mis en présence d'une bactérie qui exprime l'ARN double-brin et qu'ils vont manger [11]. Dans ces trois cas, l'inactivation du gène n'est que transitoire dans la descendance. Alternativement, on peut produire des vers transgéniques qui expriment un ARN en forme d'épingle à cheveux ce qui permet la transmission à la descendance. L'ajout d'un promoteur spécifique permet en outre une inactivation inductible [12] (*figure 1*).

L'équipe japonaise de Sugimoto, en association avec Y. Kohara, a utilisé la technique de trempage des vers. Ils ont actuellement testé l'inactivation de 2 500 gènes représentés par un clone d'ADNc, et les résultats sont accessibles sur le réseau** [13]. Parmi ceux-ci, 28 % des gènes inactivés aboutissent à un phénotype détectable comme une létalité embryonnaire ou post-embryonnaire, une stérilité, ou des anomalies morphologiques. Dans le projet « RNAi gastro-nomique » de l'équipe anglaise d'Ahringer [7], la quasi-totalité des 2 416 gènes prédits sur le chromosome I a été ciblée, sans tenir compte du fait que les gènes soient associés ou non à un ADNc. Les auteurs montrent que 14 % des gènes testés provoquent un phénotype, soit 26 % des gènes pour lesquels il existe un ADNc (sur le chromosome I, 53 % des gènes sont dans cette classe). Ces résultats

sont donc en accord avec ceux cités précédemment. L'existence d'un nombre important de mutants déjà caractérisés chez *C. elegans* a permis d'évaluer l'efficacité de cette technique. Le criblage a mis en évidence 90 % des gènes déjà connus pour provoquer une létalité embryonnaire, et 45 % de ceux qui entraînent un phénotype post-embryonnaire. L'extrapolation de ces résultats a permis d'estimer que, chez *C. elegans*, 2 300 gènes sont essentiels, et 3 100 autres gènes ont une fonction non-redondante dans les conditions de culture standard. Il est intéressant de noter que dans une première estimation fondée sur la fréquence d'obtention de mutants, Brenner avait proposé le nombre de 2 000 gènes essentiels, mais seulement 100 autres gènes non redondants associés à un phénotype visible [14]. Parmi les gènes dont l'inactivation par interférence par ARN provoque un phénotype, Arhinger *et al.* montrent un enrichissement considérable des gènes conservés dans d'autres espèces (72 % *versus* 43 %). Il existe en effet une corrélation positive entre un niveau d'expression élevé, une fonction essentielle et la conservation de séquence à travers des espèces. Une grande partie de ces gènes essentiels sont impliqués dans les processus métaboliques. Inversement, les gènes associés à un phénotype post-embryonnaire ne correspondent que rarement aux composantes de la machinerie cellulaire de base. Cette distinction est aussi corrélée avec une organisation chromosomique différente : les gènes associés à un phénotype purement post-embryonnaire se situent préférentiellement sur les bras des chromosomes, ce qui est en accord avec un modèle d'évolution des nouvelles fonctions sur les extrémités des chromosomes [15].

Le dernier projet global de Hyman à l'EMBL (Heidelberg) propose une

* http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/wormpep/

** <http://watson.genes.nig.ac.jp/db/rnai.s/index.html>

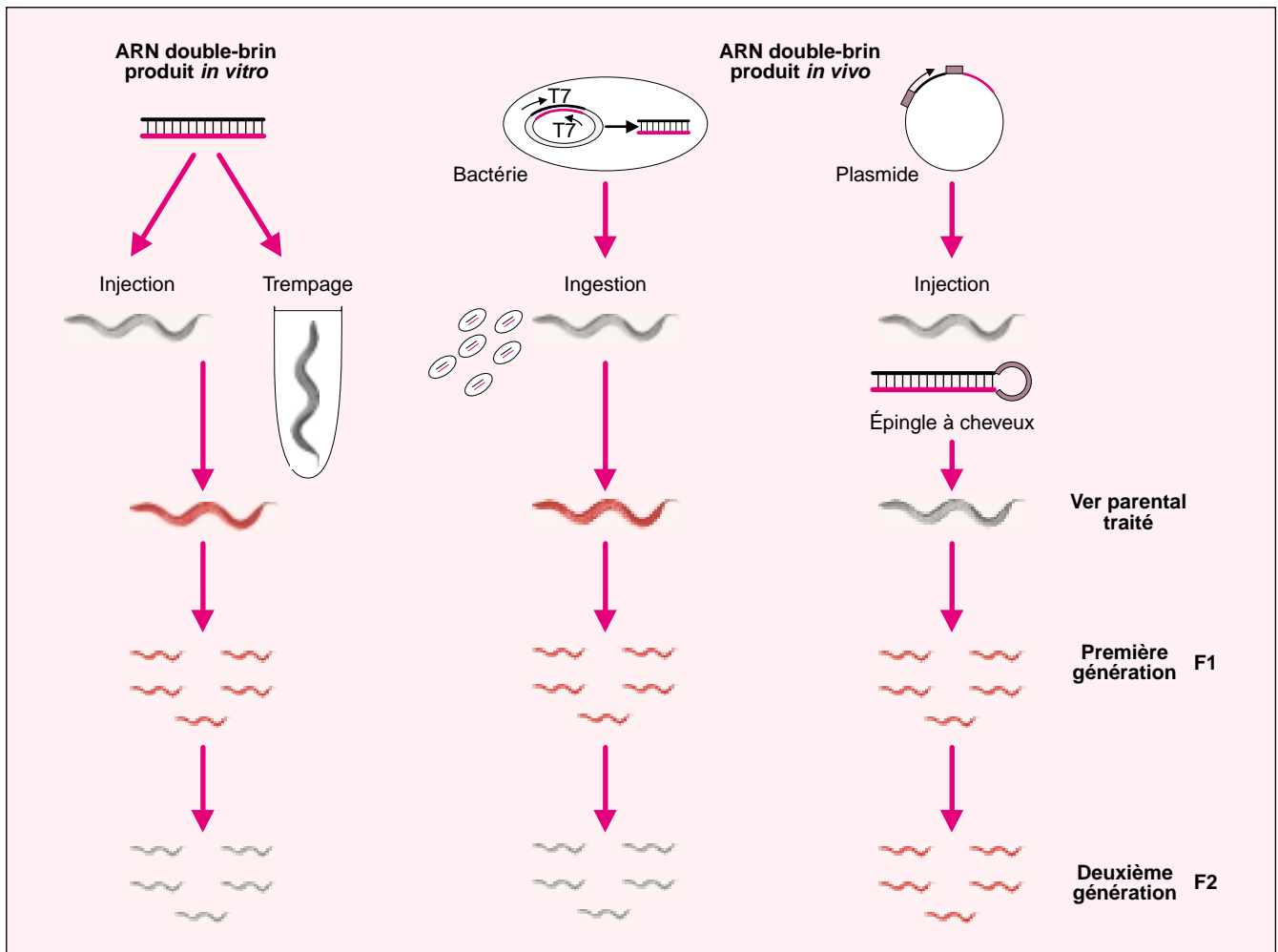


Figure 1. **Méthodes d'introduction de l'ARN double-brin chez *C. elegans*.** L'ARN double-brin synthétisé *in vitro* peut être introduite dans le ver soit en l'injectant directement (le plus souvent dans la gonade ou l'intestin), soit en trempant le ver dans une solution contenant l'ARN. Alternativement, on peut faire produire l'ARN par une bactérie qui sera ingérée par le ver. Dans ces trois cas, l'interférence par ARN n'est pas transmissible à la descendance hormis la première génération. Pour obtenir une transmission stable, il faut créer des vers transgéniques qui expriment un ARN en épingle à cheveux.

approche différente afin d'élucider une question précise: quels sont les gènes nécessaires pour la division cellulaire ? Après l'injection des ARN double-brin, les premières étapes du développement embryonnaire ont été enregistrées en microscopie Nomarski. Dans un premier temps, l'étude portait sur le chromosome III [8], et 2 232 des 2 315 des gènes prédits ont été testés*. Les auteurs ont trouvé 133 gènes nécessaires aux deux premières divisions cellulaires, et suggèrent qu'il y a plus de 1 000 gènes de ce type chez le ver. Les

différents gènes ont été classés selon leur phénotype associé, tel qu'un défaut de migration des pronucléus ou de la position du fuseau pendant l'anaphase. Certaines classes de phénotype regroupent d'une façon remarquable des gènes d'une même classe fonctionnelle. Par exemple, les 27 gènes nécessaires pour la fidélité des divisions méiotiques codent pour des protéines impliquées dans la traduction (protéines ribosomiques, ARNt synthétases, ou facteurs d'initiation); tandis que 10 des 11 gènes requis pour la progression des divisions méiotiques sont impliqués dans

protéasome. L'étude a également permis l'attribution d'une fonction à 18 gènes, sans rôle cellulaire connu jusqu'à présent. D'une façon intéressante, dans une étude similaire, mais à une échelle plus modeste et ciblée sur des gènes exprimés dans les ovaires du ver**, aucun des 81 gènes essentiels pour l'embryogenèse n'a été trouvé sur le chromosome X [16]. Ces résultats renforcent encore l'idée qu'il pourrait exister une organisation globale du génome. En résumé, ces études montrent que des analyses fonctionnelles à l'échelle

* <http://mpi-web.embl-heidelberg.de/dbScreen/>

** <http://www.rnai.org>

génomique sont réalisables chez *C. elegans*. Elles permettent l'attribution d'une fonction auparavant inconnue à plusieurs gènes, renforcent l'importance fonctionnelle des gènes conservés au cours de l'évolution et permettent une meilleure connaissance de la structure du génome. Finalement, elles permettent à beaucoup de chercheurs utilisant d'autres systèmes modèles d'avoir une idée de la fonction de leur gène préféré par un simple clic*

* <http://www.wormbase.org/>

1. 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.
2. Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E31-36.
3. Gura T. A silence that speaks volumes [published erratum appears in *Nature* 2000; 405(6786): 502]. *Nature* 2000; 404: 804-8.
4. Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a

homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999; 99: 133-41.

5. Tabara H, Sarkisian M, Kelly WG, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; 99: 123-32.
6. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 2000; 6: 1077-87.
7. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 2000; 408: 325-30.
8. Gonczy P, Echeverri G, Oegema K, et al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 2000; 408: 331-6.
9. Hill AA, Hunter CP, Tsung BT, Tucker-Kellogg G, Brown EL. Genomic analysis of gene expression in *C. elegans*. *Science* 2000; 290: 809-12.
10. Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 1998; 282: 430-1.
11. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 1998; 395: 854.
12. 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.
13. Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 2001; 11: 171-6.

14. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; 77: 71-94.
15. Barnes TM, Kohara Y, Coulson A, Hekimi S. Meiotic recombination, noncoding DNA and genomic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 141: 159-79.
16. Piano F, Schetter AJ, Mangone M, Stein L, Kempthues KJ. RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000; 10: 1619-22.

Nathalie Pujol

Laboratoire de génétique et physiologie du développement, CNRS/INSERM/Université de la Méditerranée, Case 907, 13288 Marseille Cedex 9, France.

Jonathan J. Ewbank

Centre d'immunologie de Marseille Luminy, Cnrs UMR6102, Inserm U.136, Université de la Méditerranée, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Ordre et discipline dans le testicule de drosophile.** Le développement des cellules germinales de drosophile, ovocytes dans le germa-rium, ou spermatides dans le testicule, a été disséqué avec une remarquable précision ces deux dernières années sur le plan moléculaire et morphologique, grâce à l'analyse d'innombrables mutants. Les résultats pourraient bien donner des idées aux chercheurs aux prises avec les cellules souches humaines. Que ce soit chez la drosophile mâle ou femelle, une cellule souche germinale se divise asymétriquement, une cellule fille s'autorenouvelant, l'autre s'engageant dans la différenciation qui aboutit chez le mâle à la production de 16 spermatogonies qui cesseront de se diviser et subiront une maturation en spermatocytes. Or, il s'avère que le contrôle de ces divisions asymétriques est

extrinsèque et dicté par les cellules somatiques, au contact desquelles se trouvent les cellules souches au pôle apical du testicule, situation semblable à ce qui se passe pour les ovocytes (*m/s* 1999, n°6-7, p.887) [1, 2]. Ainsi, la mutation du gène *egfr*, codant pour le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*), dans une seule des deux cellules somatiques apicales entourant la cellule germinale (*cyst cell*), entraîne un déséquilibre en faveur de l'autorenouvellement et au détriment de la différenciation, avec accumulation de cellules souches [1]. Plus en aval, le gène intervient aussi dans l'arrêt de la prolifération des cellules et, en son absence, la maturation en spermatocytes se fait mal. Le résultat est le même si l'on interfère en aval avec raf, une sérine/thréonine kinase clé de la voie de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase,

dont celui de l'EGF [2]. En revanche, la mutation de *egfr* dans les cellules germinales elles-mêmes n'a aucune conséquence. Il est probable qu'un des ligands activant l'EGF-R soit sécrété par les cellules germinales elles-mêmes, créant ainsi une boucle de rétro-contrôle qui limite l'autorenouvellement, son absence entraînant une « tumeur » germinale. Il est probable que le contrôle de certaines cellules souches des mammifères soit calqué sur ce modèle... à commencer par la spermatogenèse elle-même [3].

- [1. Kiger A, et al *Nature* 2000; 407: 750-4.]
- [2. Tran J, et al. *Nature* 2000; 407: 754-7.]
- [3. Meng X, et al. *Science* 2000; 287: 1489-93.]