

Inactivation de l'expression génique par l'ARN double-brin chez la souris

Les techniques classiques d'inactivation des gènes chez la souris ne se prêtent pas toujours à l'étude des premières phases du développement embryonnaire. En particulier, l'analyse de l'effet de l'inactivation des facteurs d'origine maternelle (protéines produites à partir des transcrits maternels) nécessite l'obtention d'ovocytes homozygotes pour la mutation. Or, l'inactivation d'un gène par recombinaison homologue peut être létale très tôt au cours du développement embryonnaire, ou être incompatible avec l'obtention d'animaux homozygotes adultes et fertiles. Dans ce cas, il est impossible d'obtenir des ovocytes^{-/-} et donc d'étudier les effets de l'inactivation d'un facteur d'origine maternelle au cours des premières divisions embryonnaires.

Chez *Caenorhabditis elegans*, la technique classique utilisée pour bloquer spécifiquement l'expression d'un gène consiste à injecter l'ARN antisens dans la gonade du ver adulte. Cela permet d'inactiver les gènes de façon sélective, mais transitoire, dans la descendance. Ce mécanisme par lequel l'ARN contrôle l'expression génétique a reçu le nom de *RNA interference* que nous traduisons par « interférence par l'ARN ». On supposait que le mécanisme impliqué dans l'interférence à ARN faisait intervenir une simple hybridation de l'ARN antisens avec l'ARNm cible endogène. De façon surprenante, plusieurs travaux rapportaient que l'injection d'ARN sens produisait les mêmes effets. Récemment, l'équipe de Fire a montré que des ARN simple-brin purifiés de façon rigoureuse perdent leur capacité d'inactiver les gènes cibles [1]. Au contraire l'injection de préparation d'ARN

double-brin provoque une inhibition spectaculaire de l'expression des gènes cibles. Ainsi, l'interférence obtenue après injection d'ARN simple-brin (antisens ou sens) serait en fait due à la présence fortuite d'ARN double-brin dans les préparations d'ARN simple-brin, résultant de l'activité non spécifique des ARN polymérase.

Depuis ces travaux, la technique d'interférence par l'ARN double-brin est très utilisée pour inactiver les gènes chez *C. elegans*, et d'autres invertébrés, drosophile, mais également *Trypanosoma Brucei*, le planaire et l'hydre (revue dans [2]). De nombreux travaux récents visent à mieux contrôler les effets de l'interférence, et en particulier à rendre l'inactivation transmissible aux générations suivantes. En effet, l'ARN injecté dans l'animal adulte se dilue au cours des divisions cellulaires, et l'inactivation qu'il entraîne est de ce fait transitoire, même si, chez *C. elegans*, qui compte au stade adulte moins d'un millier de cellules, cet inconvénient est moindre que chez les organismes plus complexes. Une méthode originale assurant une transmission de l'interférence à la descendance a été mise au point chez *C. elegans*: au lieu d'injecter un ARN double-brin dans la gonade, on produit des vers transgéniques synthétisant *in vivo* un ARN en épingle à cheveux (donc double-brin) [3]. La séquence peut être placée sous le contrôle d'un promoteur fort, inductible, la HSP (*heat shock protein*). Cette approche permet d'inactiver l'expression du gène cible à un moment précis du développement. Il est envisageable d'utiliser d'autres types de promoteurs dont l'expression est spécifique d'un tissu ou d'un type de cellules donné, permettant de

diriger, dans le temps et dans l'espace, l'expression de l'ARN double-brin *in vivo*.

Les mécanismes par lesquels l'ARN double-brin entraîne l'inactivation spécifique des gènes font l'objet de nombreuses études notamment chez les invertébrés (revues dans [2, 4-6]), et l'idée qui prévaut actuellement, du moins dans les cellules animales, est celle d'un mécanisme post-transcriptionnel entraînant la dégradation des ARNm endogènes.

L'interférence par l'ARN double-brin chez la souris ?

L'application de cette technique chez les vertébrés semblait plus aléatoire. En effet, en réponse à une infection virale, et donc à la production d'ARN double-brin, les cellules eucaryotes sécrètent de l'interféron, qui à son tour induit l'expression de tout un cortège de protéines, dont une kinase, la PKR (*ds-RNA-responsive protein kinase*) [7]. L'activation de cette kinase entraîne la phosphorylation et l'inhibition de facteurs essentiels à la traduction protéique, comme eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2alpha*), ce blocage général de la traduction entraînant la mort cellulaire par apoptose. Il était donc logique de penser que l'introduction d'ARN double-brin dans les cellules de vertébrés entraînerait leur mort.

Cependant cette règle ne semble pas absolue: nos propres travaux chez l'embryon de souris (*voir ci-dessous*) [8] et ceux menés chez le poisson-zèbre [9] ont montré que l'introduction d'ARN double-brin permettait l'inactivation de l'expression de gènes spécifiques sans provoquer la mort des cellules ainsi traitées.

Inactivation d'un transgène marqueur

Dans des expériences préliminaires, nous avons déterminé si la technique d'interférence par l'ARN double-brin pouvait être utilisée dans l'embryon de souris. Nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) de façon ubiquitaire [10]. Cette protéine présente deux avantages : (1) son expression est facilement détectable dans l'embryon *in vivo*, par examen sous microscope à fluorescence ; (2) c'est une protéine non essentielle ; les variations d'expression de la GFP n'interfèrent pas avec le développement. Nous avons injecté dans le zygote unicellulaire, un ARN double-brin obtenu après hybridation *in vitro* des ARN sens et antisens correspondant à la partie codante de la GFP. L'injection d'ARN *gfp* double-brin interfère efficacement avec l'expression de la GFP, puisque la protéine n'est pas détectée dans les embryons transgéniques après activation du génome embryonnaire, au cours de la période précédant l'implantation. De plus, les embryons injectés se développent normalement *in vitro*. Après transfert dans les femelles receveuses, ils s'implantent avec une fréquence normale et leur développement post-implantatoire est normal, ce qui indique que l'injection d'ARN double-brin est tout à fait compatible avec les premières étapes du développement embryonnaire.

Inactivation de deux gènes endogènes codant pour la E-cadhérine et *c-mos*

Dans un second temps, et afin de confirmer l'application de cette stratégie à des gènes fonctionnels, nous avons appliqué cette approche aux gènes codant pour la E-cadhérine, et pour *c-mos*. Tous deux sont exprimés au cours des premiers stades de l'embryogenèse chez la souris, et leur inactivation par recombinaison homologue ayant été réalisée, le phénotype des animaux mutants homozygotes est bien établi. Les embryons *E-cadhérine*^{-/-} présentent une altération létale du développement préimplantatoire [11, 12]. La présence de

la protéine maternelle explique qu'ils peuvent se développer normalement jusqu'au stade de morula compactée. Il existe ensuite un défaut majeur de la formation de la cavité empêchant la formation du stade blastocyste. L'injection dans le zygote d'un ARN double brin correspondant à la partie codante du gène de la *E-cadhérine* conduit à un phénotype identique à celui des embryons *E-cadhérine*^{-/-}.

Les souris *c-mos*^{-/-} présentent un développement normal jusqu'au stade adulte, mais les femelles sont généralement stériles. Les ovocytes *c-mos*^{-/-} engagent le plus souvent un développement parthénogénétique [13]. *C-mos* est en effet impliqué dans l'activité du CSF (*cytostatic factor*) responsable du blocage en deuxième division méiotique des ovocytes, blocage que lève la fécondation (*m/s* 2000, n° 4, p. 563). L'injection dans le cytoplasme ovocytaire de l'ARN double-brin correspondant à *c-mos* induit un développement « parthénogénétique » des ovocytes, semblable à celui des ovocytes *c-mos*^{-/-}. Dans ces deux types d'expériences, seul le niveau d'expression de la protéine ciblée chute brutalement après l'injection de l'ARN double-brin, alors que celui d'autres protéines n'est pas altéré, confirmant ainsi l'inactivation sélective que permet cette stratégie.

Reste à comprendre pourquoi, contrairement à ce que l'on supposait, l'embryon de souris ne répond pas de façon « suicidaire » à l'introduction d'ARN double-brin.

Conclusions

La technique d'interférence permet d'inhiber l'expression de facteurs exprimés à partir des transcrits maternels et zygotiques, ce qui en fait un outil puissant et très intéressant pour l'étude de la maturation ovocytaire et des premières phases du développement embryonnaire. Pour nombre de gènes, leur véritable fonction reste à découvrir. L'utilisation de la technique d'interférence constituera sans doute un test rapide pour déceler la fonction propre des gènes au cours du développement précoce, et ceci avant de s'engager sur la

longue voie de la recombinaison homologue. En revanche, chez la souris, comme dans la plupart des autres organismes étudiés, l'interférence ne persiste pas au cours des divisions cellulaires. Lorsque l'ARN double-brin est injecté dans le zygote (stade 1 cellule), l'expression du gène cible endogène est à nouveau détectable environ 6 jours après injection [8].

La disparition de l'effet est concomitante de l'augmentation drastique du nombre de cellules dans le bouton embryonnaire dont la masse augmente de 40 à 50 fois, ce qui correspond à plus de 6 générations. Jusqu'à présent, l'interférence n'est donc pas transmissible à la descendance chez la souris. L'obtention de souris produisant des ARN double-brin *in vivo* pourrait permettre de pallier cet inconvénient, et d'inactiver des gènes dans d'autres types cellulaires (cellules embryonnaires souches ou lignées de cellules dérivées de souris adultes par exemple). Si l'interférence par l'ARN double-brin est efficace chez la souris, il est fort probable qu'elle puisse l'être également chez les autres mammifères, et notamment chez les animaux domestiques, chez lesquels la recombinaison homologue n'est pas possible. Il faut aussi souligner la rapidité de cette technique et son faible coût.

Remerciements

Nous remercions vivement les Drs Pierre-Yves Bourillot et Marie-Odile Ott pour leurs conseils et la lecture critique de ce manuscrit, et le Pr David Glover pour les échanges scientifiques. Ces travaux ont été financés par l'organisme anglais, *Cancer Research Campaign*.

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: E31-6.
3. 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.
4. Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 1999; 15: 358-63.
5. Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* 1999; 13: 139-41.
6. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 1999; 13: 3191-7.
7. Clemens MJ. PKR-a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 945-9.
8. 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.
9. Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 156-61.
10. Zernicka-Goetz M, Pines J, McLean Hunter S, et al. Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 1997; 124: 1133-7.
11. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 855-9.
12. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8263-7.
13. Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370: 65-8.

Florence Wianny
Magdalena Zernicka-Goetz

Wellcome/CRC Institute, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QR, Royaume-Uni.