

ANNEXE XVII L'INTERFÉRENCE PAR L'ARN

Découverte par hasard en 1998, l'interférence par l'ARN suscite un intérêt croissant de la part des biologistes, et ce pour deux raisons : c'est un moyen pratique d'empêcher les gènes d'agir ; c'est aussi un mécanisme de régulation essentiel.

En fait, il existe deux formes principales d'interférence, mettant en œuvre des mécanismes quelque peu différents. L'une et l'autre font intervenir des ARN intraduisibles en protéine, appelés dans un cas ARN interférents (ARNi) et dans l'autre micro-ARN (miARN). Les ARNi ont un rôle essentiellement protecteur. C'est eux que l'on utilise pour rendre les gènes inopérants. Les micro-ARN ont un rôle régulateur dont l'importance n'a été reconnue que durant les années 1990.

XVII.A. L'INTERFÉRENCE EN TANT QU'OUTIL EXPÉRIMENTAL

L'interférence par l'ARN tend à remplacer les méthodes traditionnelles de la génétique. Elle permet de réduire un gène au silence en dégradant l'ARN messager qu'il produit. Pour la mettre en œuvre, il faut faire pénétrer ou apparaître dans les cellules un ARN db** reproduisant de manière exacte une partie de la séquence de l'ARN cible. L'ARN interférent déclenche un mécanisme de défense complexe, utilisé par les cellules des animaux et des plantes, notamment pour lutter contre l'invasion des virus à ARN et la propagation d'éléments parasites, appelés transposons.

Curieusement, l'inactivation d'un gène peut se maintenir de génération en génération, tout au moins chez *C. elegans*. Elle se transmet comme un caractère dominant, mais n'affecte pas tous les individus.

XVII.B. PRÉPARATION DES ARN INTERFÉRENTS

En principe, un ARN interférent doit comporter deux brins indépendants qui sont complémentaires et antiparallèles, tels que UGAGAA....AGUCAG et CUGACU....UUCUCA. Mais l'interférence fonctionne tout aussi bien si les séquences palindromiques font partie d'une même brin et sont séparées par une région non appariable, comportant quelques bases, notées N :

UGAGAA AGUCAGNNNNNNNCUGACU UUCUCA

Une fois synthétisée, la molécule se plie et ses deux extrémités se rapprochent. En s'appariant, elles forment une structure en tige-boucle, aussi appelée épingle à cheveux, dont la partie rectiligne a une conformation similaire à celle d'un ARN db et devient effectivement db lorsque la boucle est éliminée :

UGAGAA AGUCAG^{N N}
ACUCUU UCAGUC^{N N}

Pour que l'interférence fonctionne correctement, il faut que les deux brins soient parfaitement appariés sur toute leur longueur.

Pour synthétiser un ARN interférent, il faut recourir aux méthodes de la biologie moléculaire. L'ARN peut être fabriqué in vitro grâce à des enzymes purifiés, puis introduit dans l'animal. Il peut aussi être synthétisé in vivo dans des bactéries transformées* (*fig. XVII.A*).

Une fois qu'il a pénétré dans les cellules, l'ARN interférent est coupé par une RNase** faisant partie d'un complexe qui inclut notamment le produit d'un gène de la famille *dicer* (éminceur). La nucléase réduit l'ARNi en fragments db d'environ 20 pb, comportant une queue 3'-terminale longue de deux bases. Les fragments sont ensuite débarrassés de leur brin « sens » par un mécanisme où intervient vraisemblablement une hélicase. Les brins restants sont alors incorporés dans un autre complexe, appelé *Risc*⁺. Ce dernier contient de nombreuses protéines, dont le produit du gène de l'*X* fragile, qui est un régulateur de la traduction, et une protéine de la famille *Argonaute*, à laquelle appartient aussi le facteur d'amorçage de la traduction *eIF2*⁺. Le complexe devient actif après avoir intégré l'ARNi sb. Il favorise l'appariement entre l'ARNi et la région complémentaire de l'ARN messenger. Celui-ci est alors coupé par la nucléase Argonaute. Après avoir déclenché la destruction d'une molécule d'ARN messenger, le complexe *Risc* peut en attaquer une autre. Il a donc une fonction catalytique.

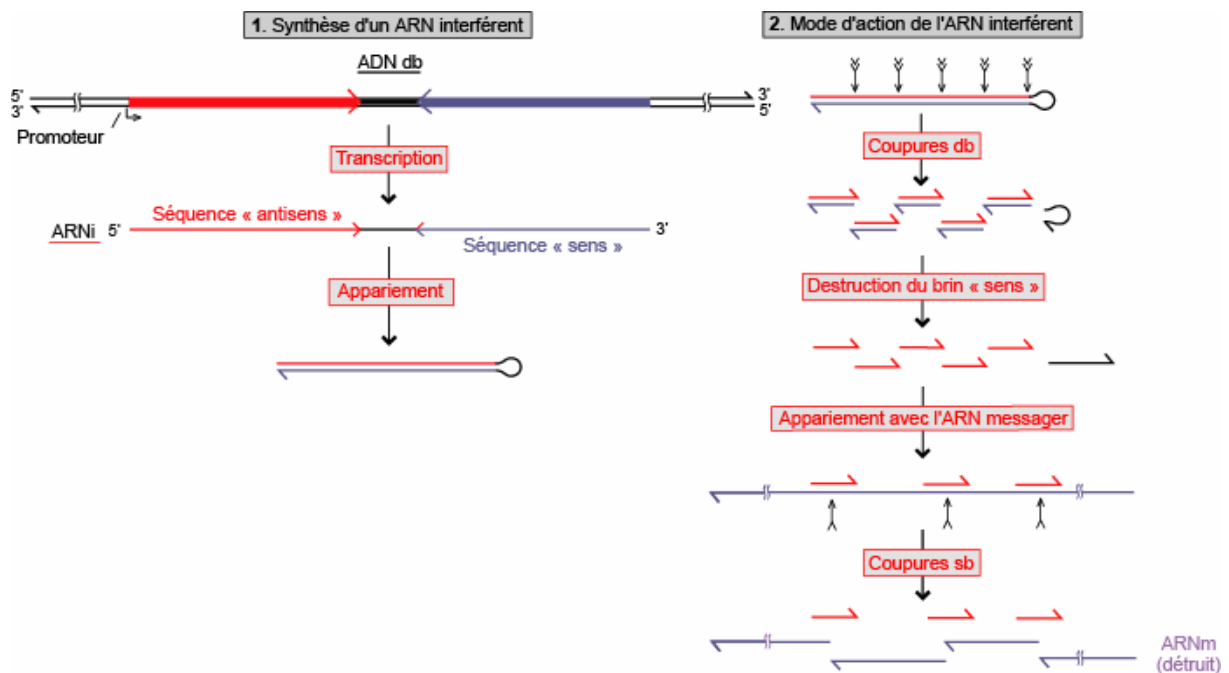


Fig. XVII.A. Mécanisme de l'interférence par l'ARN.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mettre en œuvre l'interférence par l'ARN. Celle qui est décrite ici est couramment employée chez *C. elegans*.

1. Pour synthétiser un ARN interférent, un procédé simple consiste à faire pénétrer dans une bactérie (*Escherichia coli*) un plasmide dont l'ADN contient une séquence palindromique, dont une moitié (« sens ») reproduit une séquence interne de l'ARN cible, tandis que l'autre (« antisens ») est une copie complémentaire et orientée en sens inverse de cette même séquence. Le palindrome est flanqué par un promoteur, qui oblige l'ARN polymérase de la bactérie à transcrire le gène artificiel. Dès que l'ARN est synthétisé, les deux éléments du palindrome s'apparient pour former une épingle à cheveux.

2. Pour exercer son action, l'ARN interférent doit être introduit dans les cellules du ver. Il y subit une série de transformations. Il est d'abord coupé en fragments d'environ 20 pb. Le brin « sens » des fragments est ensuite détruit, tandis que le brin « antisens » s'apparie avec l'ARN messenger, ce qui déclenche sa destruction par la nucléase Argonaute. Celle-ci coupe l'ARN messenger vers le milieu des régions db. L'ARN interférent reste intact et peut servir à couper d'autres molécules d'ARN messenger.

XVII.C. MISE EN ŒUVRE DE L'INTERFÉRENCE CHEZ LES INVERTÉBRÉS

Une particularité *C. elegans* facilite considérablement la mise en œuvre de l'interférence par l'ARN. Pour inactiver le produit d'un gène, il n'est pas nécessaire de purifier l'ARN db. Il suffit de nourrir l'animal avec des bactéries synthétisant l'ARN de séquence adéquate. Celui-ci pénètre dans les cellules de l'intestin et déclenche une réaction en chaîne qui propage l'ARN interférent dans tout l'organisme.

C. elegans partage avec les plantes une autre particularité, qui rend l'interférence particulièrement efficace : ses cellules sont capables d'amplifier l'ARNi qui a pénétré dans ses cellules. Le mécanisme de l'amplification a fait l'objet de nombreuses discussions. On a d'abord pensé qu'un ARN « antisens » produit par la nucléase Dicer (fig. XVII.A) s'apparie avec un ARN messager non encore détruit et sert d'amorce pour une réplacase appelée RdRP⁺, qui le copie et le transforme en ARN db, que la protéine Dicer s'empresse de débiter en fragments de seconde génération.

En réalité, les choses sont moins simples. Selon des travaux récents, un ARN « antisens » primaire recruterait au niveau de son site d'interaction avec l'ARN messager la réplacase RdRP, qui synthétiserait des fragments d'ARN « antisens » contigus, comportant environ 20 bases (fig. XVII.B). Ces ARN portent à leur extrémité 5' un groupement triphosphate, ce qui prouve qu'ils sont synthétisés de manière indépendante et ne résultent pas d'une coupure pratiquée dans un ARN plus long.

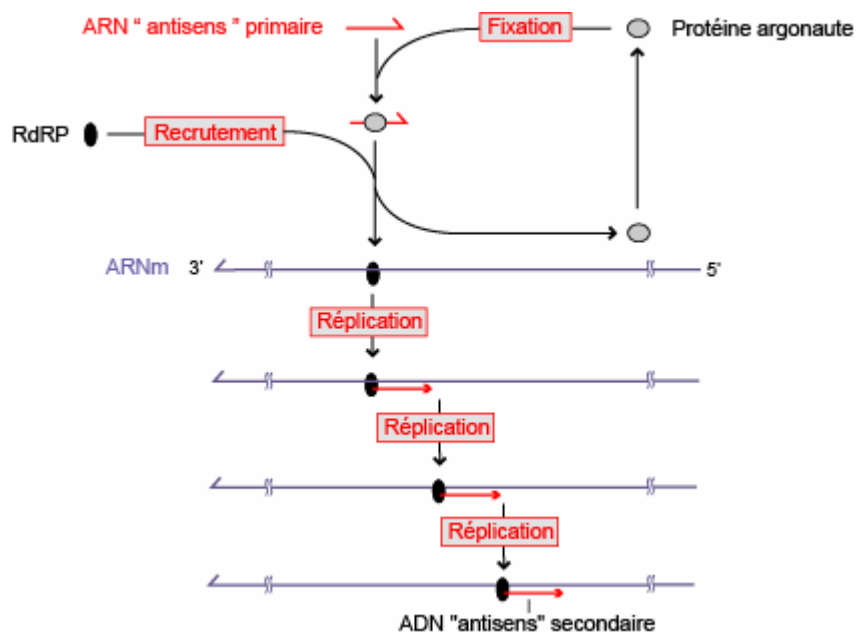


Fig. XVII.B. Amplification de l'ARN interférent chez *C.elegans*.

Les fragments d'ARN « antisens » produits par la RNase Dicer ne se contentent pas de déclencher la destruction de l'ARN messager par le complexe Disc. Ils peuvent aussi amorcer la production d'ARN « antisens » secondaires. Ils utilisent pour cela un élément de ce complexe (une variété de la protéine Argonaute) pour recruter la réplacase RdRP, qui produit des séries adjacentes de courts ARN « antisens ». Les ARNi secondaires peuvent à leur tour déclencher la destruction d'autres molécules d'ARN messager. Le mécanisme par lequel la réplacase est recrutée à l'endroit correct sur l'ARN messager reste mal connu.

L'interférence par l'ARN fonctionne également chez la drosophile, mais elle est plus difficile à mettre en pratique. Contrairement à *C. elegans*, la drosophile n'a pas de systèmes d'amplification et de propagation du signal véhiculé par l'ARN db.

XVII.D. MISE EN ŒUVRE DE L'INTERFÉRENCE CHEZ LES MAMMIFÈRES

Les mammifères ne peuvent pas non plus amplifier ni propager les signaux matérialisés par les ARN db. L'interférence fonctionne bien dans les cellules en culture. L'ARN interférent doit être très court (moins de 30 bases), sinon il déclenche un système de défense faisant intervenir l'interféron, une petite protéine synthétisée en réponse à une infection virale. En synergie avec l'ARN db, l'interféron déclenche une cascade d'interactions qui arrête la synthèse protéique en inactivant un facteur de traduction et détruit sans discrimination les ARN messagers en activant une RNase.

L'interférence par l'ARN peut être utilisée dans les cellules de mammifère comme substitut à l'invalidation permanente des gènes (*annexe XI*). Une méthode efficace consiste à transformer* les cellules au moyen d'un vecteur d'expression* contenant un gène artificiel piloté par un promoteur puissant, reconnu par l'ARN polymérase III*, qui est active dans toutes les cellules. Le gène comporte une séquence d'ADN d'environ 50 pb**, qui spécifie un ARN dont les extrémités sont complémentaires et antiparallèles, donc susceptibles de s'apparier en formant une épingle à cheveux, que la protéine Dicer peut convertir en ARN db.

XVII.E. MISE EN ŒUVRE DE L'INTERFÉRENCE IN VIVO

Le plus grand problème rencontré chez les mammifères consiste à faire fonctionner l'interférence in vivo. Pour y parvenir, il faut faire entrer l'ARN dans les cellules de l'organisme vivant. La distribution directe par la voie systémique est inutilisable, parce que les ARN sont rapidement éliminés par les reins ou détruits par les nucléases sanguines. Différents procédés sont en cours d'expérimentation pour surmonter cet obstacle.

Un moyen ingénieux expérimenté chez la souris consiste à fixer une molécule de cholestérol* sur le brin « sens » de l'ARN interférent et à injecter le tout dans une veine de l'animal. L'ARN pénètre efficacement dans les cellules du foie, de l'intestin, des reins, des poumons et d'autres organes. Dans un premier essai réalisé avec un ARN interférent dirigé contre l'ARN messenger APOB** (un transporteur de cholestérol), on a obtenu chez les souris traitées une baisse significative du taux sanguin de ce transporteur, ainsi que du taux global de cholestérol.

Un deuxième moyen de faire pénétrer l'ARN dans les cellules tout en les protégeant contre les nucléases est de les inclure dans des liposomes (vésicules lipidiques). Injectés dans les veines, les liposomes fusionnent avec la membrane plasmique des cellules et délivrent leur contenu à l'intérieur. Ce système fonctionne dans le foie. Il a été utilisé avec succès pour inhiber la réplication du virus de l'hépatite B.

Une troisième manière de procéder consiste à introduire un cheval de Troie dans les cellules, en infectant les animaux par un virus dont l'ADN contient l'information nécessaire pour produire un ARN qui formera une épingle à cheveux, dont un demi-élément est complémentaire de l'ARN cible. Ce système a permis d'inhiber l'expression du virus de l'hépatite B dans le foie.

Une dernière méthode adaptée au cerveau recourt à un peptide dérivé de la glycoprotéine du virus de la rage, qui pénètre dans les neurones en se liant au récepteur de l'acétylcholine présent à leur surface. On a ajouté au peptide une séquence de neuf arginines dont les charges positives sont capables de retenir l'ARNi par attraction électrostatique. L'administration par voie intraveineuse d'un complexe peptide-ARNi dirigé contre le virus de l'encéphalite protège les souris contre cette maladie fatale.

Mais certaines de ces méthodes ont quand même des inconvénients. En premier lieu, les petits ARN db semblent malgré tout capables d'activer le système de défense gouverné par l'interféron, surtout s'ils sont présents en grandes quantités. L'interférence risque donc de détruire d'autres ARN que celui qui est visé. Ce danger ne doit pas être sous-estimé, parce que les ARN interférents pourraient reconnaître des ARN de séquence légèrement différente de la leur, donc éteindre, non seulement le gène visé, mais aussi toute une famille de gènes paralogues. Par ailleurs, si l'ARN interférent est produit en trop grande quantité dans un organe tel que le foie, les animaux traités souffrent de graves lésions à cet endroit. Beaucoup meurent prématurément. Selon toute vraisemblance, les ARN interférents empêchent les micro-ARN de remplir correctement leur office, parce qu'ils entrent en compétition avec eux pour des protéines, telles que Dicer, qui les manipulent (*section B*).

XVII.F. L'INTERFÉRENCE EN TANT QUE MÉCANISME RÉGULATEUR

Chez tous les eucaryotes pluricellulaires étudiés jusqu'à présent et chez certains unicellulaires, les micro-ARN sont les instruments d'un mécanisme régulateur essentiel, qui empêche certains gènes de s'exprimer. Le système opère pendant toute la vie des animaux, et en premier lieu au cours de l'oogenèse et de la croissance. Son rôle principal consiste à déclencher la destruction ou à empêcher la traduction de plusieurs espèces d'ARN messager (ARNm). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les micro-ARN sont très abondants dans les cellules, car ils ne sont dégradés que lentement.

Certains gènes spécifiant les micro-ARN sont organisés en opérons, en ce sens qu'ils contiennent l'information nécessaire pour la synthèse de plusieurs de ces ARN, qui dérivent d'un précurseur commun. Les micro-ARN apparaissent sous la forme de molécules de grande taille, qui subissent un début de maturation* semblable à celle de l'ARN pré-messager : fixation d'une coiffe (m^7Gppp) et d'une queue poly(A), épissage. La maturation finale fait intervenir deux RNases de type III, qui ont le pouvoir de couper les molécules d'ARN db : **Drosha*** et Dicer.

L'interférence ne se contente pas d'agir sur les produits des gènes. Elle contribue également à modeler la structure de la chromatine*, en particulier au niveau des régions condensées, telles que les centromères, qui comportent des séries de courtes séquences répétées en tandem, c'est-à-dire suivant la même orientation. Elle intervient dans le processus d'hétérochromatisation*, d'une manière qui n'est pas encore parfaitement comprise. À ce niveau, les ARN interférents réduisent les gènes au silence,

non pas en bloquant la traduction des ARN messagers, mais en inhibant la transcription. Les micro-ARN jouent également un rôle dans la formation du fuseau mitotique.

Un des systèmes d'interférence les mieux connus fait intervenir le miARN lin4** et l'ARNm lin14 chez *C. elegans*. L'ARN lin4 inhibe la traduction de l'ARN lin14, si bien que la protéine Lin14 n'est pas synthétisée (*fig. XVII.C*).

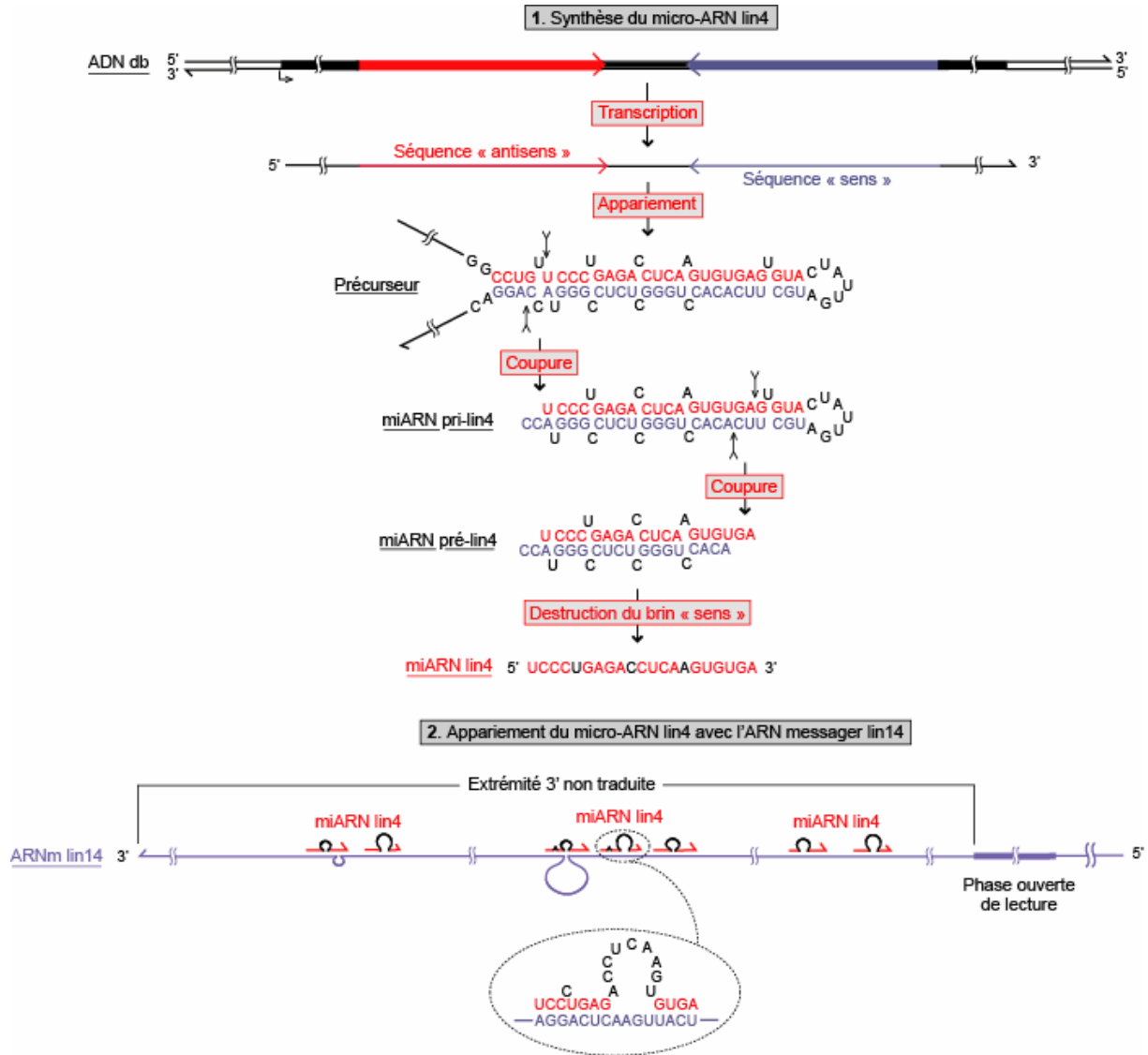


Fig. XVII.C. Interaction entre le micro-ARN lin4 et l'ARN messenger lin14 de *C. elegans*.

1. Le micro-ARN lin4 est synthétisé sous la forme d'un précurseur de longueur indéterminée, dont la partie médiane contient un palindrome imparfait. Les deux membres du palindrome s'apparient en laissant subsister dix nucléotides en dehors de la double hélice. Le précurseur est d'abord coupé par la nucléase Droscha, qui élimine les régions situées de part et d'autre de la région palindromique. Le précurseur secondaire, appelé pri-lin4, ne contient plus que 61 bases. Il est envoyé dans le cytoplasme, où la nucléase Dicer lui fait subir une coupure décalée qui élimine la boucle, créant ainsi une molécule db, appelée pré-lin4. Le brin « sens » de cette molécule est finalement détruit, ce qui libère le micro-ARN lin4, long de 21 bases.

2. Le micro-ARN lin4 est incorporé dans le complexe Risc, qui favorise son association avec la région de l'ARN messenger lin14 située du côté 3' par rapport à la phase ouverte de lecture. Cette région comporte sept séquences partiellement complémentaires du micro-ARN lin4. L'appariement est imparfait et laisse subsister des nucléotides en dehors de la séquence db. Ces structures inhibent la traduction de l'ARN messenger ou déclenchent sa dégradation, par des mécanismes qui font encore l'objet de discussions.

XVII.G. RÔLE DES MICRO-ARN CHEZ *C. elegans*

La mutagenèse classique a permis d'identifier une dizaine de gènes dont l'inactivation provoque des hétérochronies* de croissance. Six de ces gènes appartiennent à la catégorie *lin***, et un septième à la catégorie *let**.

Nous ne nous intéresserons ici qu'aux gènes *lin4*, *lin14*, *let 7* et *lin41*. Les deux premiers de ces gènes contrôlent le passage du premier au deuxième stade larvaire, tandis que les deux derniers contrôlent la conversion de la larve en adulte (**fig. XVII.D**). Les mutants *lin14* réitèrent en permanence le premier stade. Les mutants *lin41* omettent le troisième ou le quatrième stade. Les gènes *lin4* et *let7* empêchent les gènes *lin14* et *lin41* de s'exprimer, en interférant avec la traduction de leurs ARN messagers. La fonction des protéines Lin14 et Lin41 n'est pas connue avec précision.

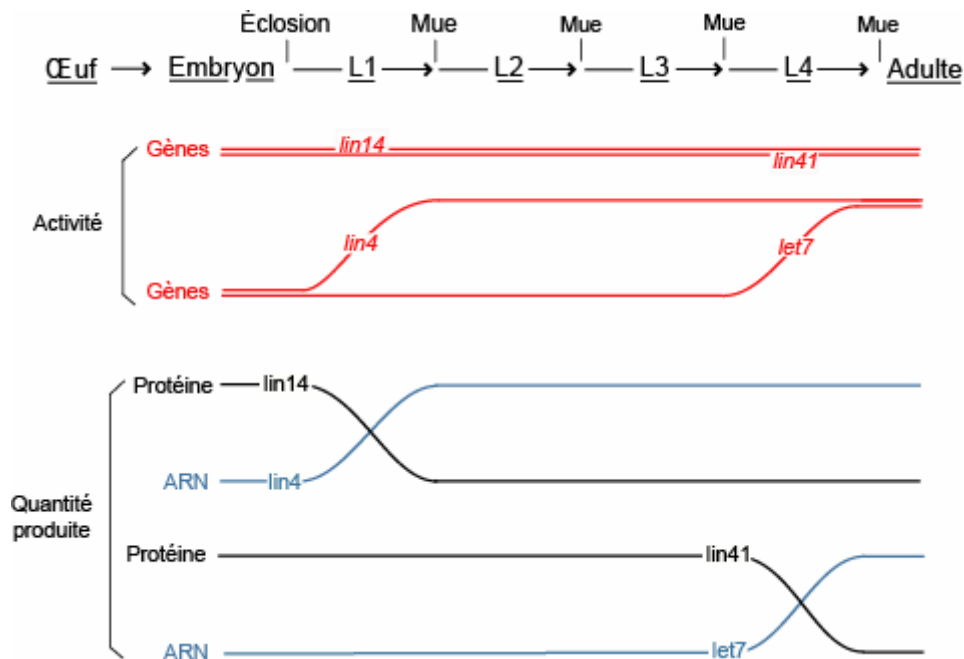


Fig. XVII.D. Interaction entre deux paires d'ARN au cours de la croissance de *C. elegans*.

La larve croît de manière discontinue, en passant par quatre stades (L1 à L4). Les gènes *lin14* et *lin4* contrôlent le début de la croissance, et plus particulièrement la transformation de la larve de premier stade en larve de deuxième stade. Les gènes *lin41* et *let7* contrôlent la fin du processus, c'est-à-dire le passage du dernier stade larvaire à l'état adulte. Les gènes *lin14* et *lin41* sont actifs en permanence. Le gène *lin4* devient actif durant le stade L1, tandis que le gène *let7* le devient durant le stade L4. Les gènes *lin4* et *let7* produisent des micro-ARN qui s'associent avec les ARN messagers produits par les gènes *lin14* et *lin41*, ce qui bloque la traduction et inhibe la synthèse de la protéine Lin14, puis de la protéine Lin41.

(D'après Banerjee D et Slack F. *BioEssays* 2002; **24**: 119-29, modifié)

XVII.H. RÔLE DES MICRO-ARN CHEZ LES MAMMIFÈRES

On estime à 1 % le nombre gènes produisant des micro-ARN chez les mammifères. Les chromosomes humains en contiennent au moins 500. Leurs produits sont désignés par des chiffres (miR-1, miR-2, etc.) ou par des sigles (tels que let7), si leur séquence ressemble à celle de micro-ARN découverts initialement chez *C. elegans*. Au total, les micro-ARN contrôleraient l'expression d'au moins un tiers du nombre total de gènes, car chacun d'eux est capable d'interagir avec une multitude d'ARN cibles. Par ailleurs, il existe quatre types différents de protéine Argonaute (Ago1 à 4), dont seul le deuxième fonctionne comme nucléase.

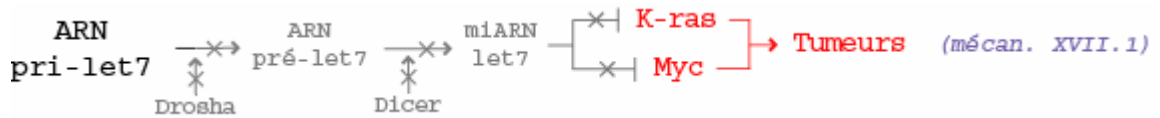
Les micro-ARN jouent un rôle essentiel pendant l'oogenèse. C'est ce qu'a montré l'invalidation conditionnelle du gène *dicer* (*annexe XI.B*) dans les oocytes de souris en phase d'accroissement. Durant cette période, les cellules restent bloquées en prophase de la première division de méiose et ne redémarrent qu'au moment de l'ovulation. Suivant certains auteurs, l'invalidation a pour effet de désorganiser le fuseau mitotique et de perturber l'attachement des chromosomes à ses fibres, si bien que la division ne peut pas s'achever. Une intervention similaire réalisée par d'autres chercheurs laisse l'oogenèse se dérouler jusqu'à son terme. Les ovules produits par les femelles mutantes ont un aspect tout à fait normal, bien qu'ils ne contiennent pas de micro-ARN en quantité détectable. Toutefois, les œufs obtenus en fécondant ces ovules in vitro ne peuvent pas se diviser, apparemment à cause d'anomalies dans la formation du premier fuseau mitotique.

Les micro-ARN jouent un rôle tout aussi essentiel au cours du développement embryonnaire, comme l'a montré l'invalidation du gène *dicer* : les fœtus de souris *dicer*^{-/-} meurent in utero avant même le milieu de la gestation. Par ailleurs, il a été impossible d'obtenir des cellules ES** *dicer*^{-/-}, ce qui donne à penser que l'action des micro-ARN est indispensable pour que les cellules souches puissent proliférer.

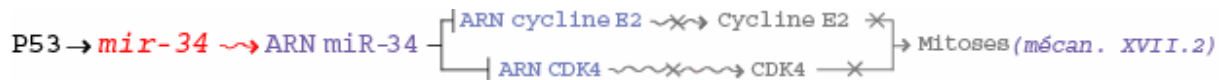
Les micro-ARN ont encore bien d'autres fonctions, comme le montrent plusieurs expériences visant à invalider les gènes des micro-ARN chez la souris (*annexe XI*). L'une de ces expériences a consisté à rendre non fonctionnel le gène *mir-155*. Les animaux *mir-155*^{-/-} sont viables et fertiles, mais souffrent de problèmes de l'immunité.

XVII.I. RÔLE DES MICRO-ARN DANS L'ÉTIOLOGIE DU CANCER

Chez les mammifères, les micro-ARN jouent un rôle dans la formation des tumeurs, car les cellules cancéreuses contiennent globalement moins de ces ARN que les cellules normales. Diverses interventions expérimentales confirment la réalité de cette implication. Par exemple, si l'on réduit dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire la production des micro-ARN en inhibant grâce à l'interférence par l'ARN la synthèse des nucléases Drosha ou Dicer, la capacité de prolifération de ces cellules est fortement accrue. Une des cibles de ces nucléases est le miARN let7, qui a lui-même comme cibles les ARN messagers des oncoprotéines K-Ras** et Myc**. Les nucléases Drosha et Dicer empêchent donc la synthèse de ces protéines. Ce faisant, elles se comportent comme des suppresseurs de tumeur, comme le miARN let7 :



La synthèse de certains micro-ARN est soumise à la protéine P53. C'est le cas notamment pour l'ARN miR-34, dont il existe trois variétés, spécifiées par deux gènes différents. La protéine P53 active les gènes *mir-34*, dont les produits inhibent la traduction de plusieurs ARN messagers, dont ceux de la cycline E2 et de la kinase CDK4, inhibant ainsi le franchissement du point R du cycle cellulaire (*annexe XIV.B*) :



XVII.J. COMPARAISON ENTRE LES DEUX TYPES D'INTERFÉRENCE

Les deux mécanismes où interviennent les ARN interférents présentent de nombreux points communs. En particulier, la protéine Dicer et le complexe Risc interviennent dans chacun d'eux. La nucléase Dicer produit des fragments d'ARN db d'environ 20 pb portant une courte queue sb à ses deux extrémités 3'. Le complexe Risc favorise l'association des ARN interférents avec leurs ARN cibles (*fig. XVII.A et C*).

Mais il existe aussi de nombreuses différences entre les deux mécanismes. Ainsi, la nucléase Drosha ne participe vraisemblablement pas à la maturation des ARNi ayant un rôle défensif. D'autre part, les précurseurs des ARNi et des miARN sont coupés par deux types distincts de protéine Dicer : DCR2 dans le premier cas et DCR1 dans le second. Une troisième différence concerne la qualité des structures db que forme l'ARN interférent avec l'ARNm. Si les appariements sont parfaits, l'ARNm est détruit (*fig. XVII.A*). Mais s'ils sont imparfaits, ce n'est pas nécessairement le cas (*fig. XVII.C*). La décision de mettre en œuvre tel ou tel type d'inhibition dépend de la nature de la nucléase Dicer. La forme DCR2 guide l'incorporation des ARN parfaitement appariés dans un complexe Risc contenant un type particulier de protéine Argonaute (Ago2). Les ARN imparfaitement appariés intègrent un complexe Risc contenant une nucléase Argonaute peu efficace. Ils ne seraient donc pas obligatoirement coupés.

Apparemment, l'inhibition exercée par les micro-ARN fait intervenir plusieurs processus, qui peuvent coexister. Suivant certains auteurs, les complexes miARN-ARNm ne pourraient pas être traduits parce que l'amorçage ou l'élongation des chaînes protéiques est bloquée. Par exemple, l'ARN let7 et les protéines qui lui sont associées bloqueraient le processus d'amorçage en empêchant d'agir le facteur eIF4F**. D'autres chercheurs incriminent la stabilité des ARN messagers, qui perdraient tout d'abord leur queue poly(A), puis leur coiffe (m⁷Gppp), ajoutées l'une et l'autre lors du processus de maturation*, et seraient finalement dégradés. Il semble que ces opérations ont lieu au moins en partie dans des particules spéciales, appelées **P** (pour *Processing*), qui contiennent des désadénylases, des enzymes « décoiffants », des exonucléases, ainsi qu'une partie des molécules de nucléase Argonaute, élément constitutif du complexe Risc.

SIGNIFICATION DES SIGLES ET ACRONYMES

***Drosha**. *Drosophila RNase III*.

***let^{*}**. *lethal*.

***eIF2**. *eukaryotic Initiation Factor 2*.

***RdRP**. *RNA-dependent RNA Polymerase*.

***Risc**. *RNA-induced silencing complex*.

BIBLIOGRAPHIE

Usages pratiques de l'interférence

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; **296**: 550-3.

Dykxhoorn DN, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; **126**: 231-5.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA *et al*. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006; **441**: 537-41.

Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E *et al*. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007; **448**: 39-43.

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature Rev Genet* 2004; **5**: 355-65.

Moss EG, Taylor JM. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nature Cell Biol* 2003; **5**: 771-2

Rossi J. A cholesterol connection in RNAi. *Nature* 2004; **432**: 155-6.

Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003; **19**: 9-12.

Skipper M. Have our dreams been shattered? *Nature Rev Genet* 2003; **4**: 671.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K *et al*. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; **432**: 173-8.

Fonctionnement de l'interférence

Baulcombe DC. Amplified silencing. *Science* 2007; **315**: 199-200.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchinson EP *et al*. Dicer is essential for mouse development. *Nature Genet* 2003; **35**: 215-7.

Couzins J. Erasing microARNs reveals their powerful punch. *Science* 2007; **316**: 530.

Dautry F, Ribet C. L'interférence par l'ARN. Vers une génomique fonctionnelle chez les mammifères ? *Med Sci* 2004; **20**: 815-9.

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.

Fraser A. Human genes hit the big screen. *Nature* 2004; **428**: 375-8.

Hammond SM. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nature Genetics* 2007; **39**: 382-3.

Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Brière C. Les microARN. Une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique ? *Med Sci* 2004; **20**: 894-8.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E *et al*. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; **447**: 1130-4.

Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G *et al*. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003; **421**: 231-7.

- Mathonet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A *et al.* MicroRNA inhibition of translation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007; **317**: 1764-7
- Murchinson EP, Stein P, Xuan Z, Pan H *et al.* Critical roles for Dicer in the female germ line. *Genes Dev* 2007; **21**: 682-93.
- Nilsen TW. Mechanisms of microARN-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet* 2007; **23**: 243-9.
- Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P *et al.* Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007; **21**: 644-8.
- Förstermann K, Horwich MD, Wee LM, Tomari Y, Zamore PD. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct Argonaute complexes after production by Dicer-1. *Cell* 2007; **130**: 287-97.
- Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, Müller F *et al.* Long-term gene silencing by RNAi. *Nature* 2006; **442**: 882.