

Génie génétique : vers une nouvelle technologie applicable à l'abeille ?

La presse a fait état au mois d'avril d'une nouvelle technologie qui fait débat, basée sur le « silençage génétique » d'un organisme indésirable. Grâce à un processus basé sur l'ARNi, la production de protéines nécessaires à une fonction vitale est bloquée et provoque la mort à coup sûr du nuisible, sans recourir à une substance chimique dans le produit pulvérisé. Sommes-nous en présence d'une avancée qui permettra un jour de lutter contre le varroa ? Ou face à une innovation dont les retentissements sur l'environnement et la santé humaine sont incertains, un peu à l'image des OGM ? Le point sur les connaissances et perspectives...

par **Marc-Edouard Colin**, Docteur en sciences, docteur vétérinaire

Les nouvelles techniques de génie génétique (NTGG) permettent d'augmenter le nombre de modifications génétiques et de modifier plus rapidement et à moindre coût le génome de tous les êtres vivants : les plantes, les animaux, les insectes, les champignons... Par comparaison avec la chirurgie, on pourrait dire que les nouvelles techniques sont moins lourdes et ont un meilleur pourcentage de réussite, parce qu'on intervient seulement sur une partie d'un gène ou sur son fonctionnement.

L'intervention sur le gène lui-même, appelée mutagenèse dirigée ou édition génomique, consiste à couper un gène à un endroit très précis grâce à des ciseaux moléculaires ce qui permet d'inclure, lors de la réparation, une séquence génétique choisie construite artificiellement ou non. À l'inverse, l'interférence ARN ne modifie pas le gène mais bloque son expression, c'est-à-dire la synthèse d'une protéine. Cette technique d'interférence est développée dans cet article.

Quarante années après la découverte de la synthèse d'une protéine (voir encadré ci-dessous), la découverte d'un nouvel ARN, l'ARN interférent (ARNi), par Fire

et Mello, a, elle aussi, été récompensée par un prix Nobel en 2006 (voir encadré page suivante).

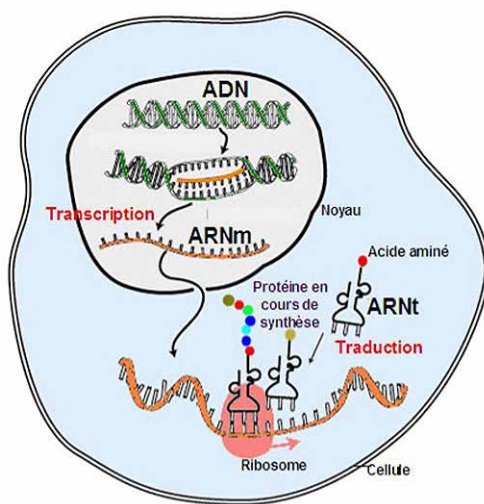
La fabrication d'une protéine

Les organismes vivants pluricellulaires, comme les invertébrés et les vertébrés sont constitués généralement de plusieurs milliards de cellules organisées en tissus et en organes. Chaque cellule possède un noyau qui renferme la majeure partie de l'acide désoxyribonucléique (ADN) de la cellule, l'autre partie étant contenue dans les mitochondries, petites structures cytoplasmiques spécialisées dans la production d'énergie. L'ADN est une longue molécule structurée comme une échelle en double hélice, dont chaque barre est l'une des quatre bases azotées (adénine, guanine, thymine, cytosine). Un véritable code-barres, support de l'information génétique, est formé par les alternances des bases azotées. Cet ADN constitue le génome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes de l'organisme, organisés en plusieurs chromosomes.

Lors de la synthèse des protéines, l'ADN (double brin) est transcrit, dans le noyau, en acide ribonucléique messager (ARNm), constitué d'un seul brin. Cet ARNm migre ensuite du noyau dans le cytoplasme et se fixe à un ribosome qui reçoit des ARN de transfert (ARNt), porteurs des différents

acides aminés, dans un ordre défini par l'ARNm. L'assemblage séquentiel des acides aminés va fabriquer une chaîne protéique pour créer des structures spatiales, des enzymes, des transporteurs, des réserves d'acides aminés, etc. (voir figure 1). Cette découverte, attribuée à Lwoff, Monod et Jacob, a été récompensée par le prix Nobel en 1965.

FIGURE 1.
Schéma de la synthèse d'une protéine.



Le processus d'interférence déclenché par l'ARNi, ancien mais très conservé chez les organismes pluricellulaires, serait un système de défense et de maintien de l'intégrité du génome d'une

cellule, chargé de lutter contre les infections virales ou les gènes « sauteurs » (transposons), capables de changer de localisation sur l'ADN d'un chromosome.

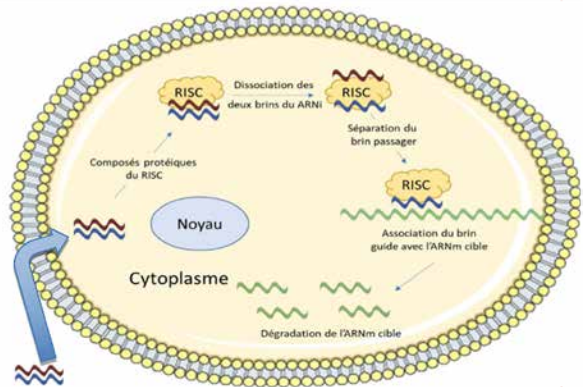
L'ARN interférent (ARNi)

L'ARNi se comporte comme un imposteur car il prend la place d'un ARN messager sur le ribosome et détruit son message. C'est une des façons de rendre un gène non fonctionnel, d'où le terme « silençage de gène » (gene silencing). À la différence de l'ARN messager monobrin, il se présente comme un double brin ou double hélice (ARNdb).

Pour pénétrer dans une cellule, cet ARNdb soit se colle à la membrane cellulaire qui réagit en créant une vacuole pénétrant et migrant ensuite dans le cytoplasme cellulaire, soit utilise un canal transmembranaire. Une fois dans le cytoplasme, le double brin d'ARNdb est raccourci au moyen de l'enzyme DICER (ribonucléase de type 3). Ce double brin modifié est appelé siARN (petit ARN interférent). Ces siARN vont se lier à la protéine « Argonaute » pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le complexe permet la dissociation des 2 brins du siARN, en un brin guide et un brin passager. Le brin guide reste attaché au complexe RISC alors que le brin passager est détaché et éliminé dans le cytoplasme.

Le brin guide reconnaît seulement une partie du simple brin de l'ARN messager correspondant à son code génétique, ce qui a pour conséquence sa cassure et sa dégradation par le complexe RISC. Après la destruction d'un ARNm, le complexe RISC redevient fonctionnel.

FIGURE 2. Mécanisme d'action des ARN interférents (ARNi) d'après Fattal, 2020.



ARN double

De façon normale, la cellule produit aussi des ARN à double brin, les micro-ARN (miARN), comparables aux siARN et ayant pour rôle le contrôle de l'expression des gènes.

Quelles applications pour les ARN interférents ?

Les ARN double brin, précurseurs des ARN interférents, sont des molécules issues de la synthèse et produites soit par des sociétés de biotechnologie, soit par des firmes pharmaceutiques. Ils peuvent avoir plusieurs applications.

1 – En médecine humaine

Le recours aux ARN interférents vise à arrêter la fabrication d'une protéine responsable de maladie. Plusieurs médicaments utilisant ces ARN sont disponibles, par exemple pour le traitement d'une dystrophie musculaire, de l'hypercholestérolémie, de l'amylose héréditaire etc. Il en est de même pour des vaccins très récents. Le traitement de certains cancers s'envisage aussi avec cette classe de médicaments.

2 – Dans la lutte contre les ravageurs et maladies des cultures

La lutte s'envisage par la mise en œuvre de trois méthodes : l'induction du silençage d'un gène chez le ravageur après consommation d'un végétal produisant un ARN interférent ; la contamination du ravageur après pulvérisation directe d'un ARNi sur la plante ; l'ingestion d'un virus porteur de cet ARNi et infectant la plante (voir Christiaens *et al.*, 2020).

a. Induction du silençage *via* la plante hôte (*Host-Induced Gene Silencing* – HIGS)

Ce silençage passe par la création d'une plante transgénique dont au moins un gène exprime un ARN interférent, destiné à arrêter la synthèse d'une protéine vitale chez le ravageur lorsqu'il aura consommé cette plante modifiée.

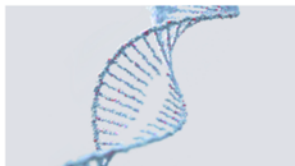
FIGURE 3. Extrait de la fiche technique de SmartStax Pro, de la société Bayer-Monsanto.

PROTECTION À LA SURFACE ET SOUS LA SURFACE



La technologie SmartStax^{MD} PRO offre une protection de premier ordre contre les ravageurs de surface et souterrains, notamment la pyrale du maïs, la légionnaire d'automne, le ver-gris noir et le ver de l'épi du maïs.

TECHNOLOGIE INNOVANTE À ARNi



La technologie ARNi perturbe la création des protéines essentielles à la survie du ver-gris.

UNE PROTECTION DES NŒUDS RACINAIRES 3X SUPÉRIEURE



La technologie SmartStax^{MD} PRO offre une protection des nœuds racinaires 3 fois supérieure à celle des produits Gromé^{MD} testés dans des environnements soumis à une forte pression de chrysomèle des racines du maïs*.

La technologie HIGS a été expérimentée avec succès contre certains pucerons, le doryphore des pommes de terre et la noctuelle du coton (voir Karimi et Innes, 2022). Cependant, la première commercialisation d'une plante OGM exprimant un ARNi est un maïs, nommé SmartStax Pro, approuvé aux USA en 2017 par la société Bayer-Monsanto. Ce maïs héberge huit gènes étrangers et une séquence génétique artificielle codant pour un ARN double brin interférent avec l'ARN messager de la protéine *snf7* de la chrysomèle des racines, avec pour résultat d'inhiber une fonction essentielle à la vie des cellules de cet insecte. Ce nouvel apport dans la technologie OGM est parfois qualifié de première pierre d'un édifice futur.

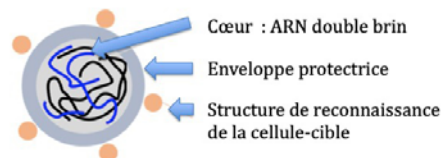
b. Pulvérisation d'ARN interférent (*Sprays Inducing Gene Silencing – SIGS*)

La pulvérisation est un moyen de contaminer un ravageur plus directement que par ingestion d'une plante génétiquement modifiée, mais cela ne signifie pas une contamination plus simple. Des facteurs externes comme les UV, la pluie, et des micro-organismes peuvent occasionner la dégradation de l'ARN double brin. Après son ingestion par

le ravageur, l'ARNdb doit aussi résister à des changements de pH et à l'action de nucléases sécrétées par les cellules intestinales ou par des bactéries de la flore intestinale, avant de pénétrer dans l'hémolymphe. Ensuite, l'ARNdb doit reconnaître sa cellule-cible, étape dite d'adressage. Dans la réalité, c'est une multitude de cellules composant un tissu ou une partie d'un organe qui sont des cibles, donc il faut un nombre minimum d'ARNdb, autrement dit une dose significative, pour atteindre une réelle efficacité.

Compte tenu de la fragilité des ARNdb dans l'environnement, leur formulation en nano-particules est privilégiée d'autant plus qu'elle augmenterait la diffusion des particules dans l'organisme du ravageur ainsi que leur pénétration dans les cellules-cibles (voir figure 4). Techniquement, cette formulation permettrait une application dirigée sur le feuillage, le tronc ou les racines selon la localisation du ravageur. Pour surmonter la résistance des insectes aux insecticides, la pulvérisation d'ARNdb, construits pour inhiber la détoxification chez l'insecte ravageur, est proposée par Kaleem Ullah *et al.* (2022).

FIGURE 4. Conception d'une nano-particule (d'environ 10 millièmes de mm) porteuse d'ARN double brin, d'après Fattal, 2020.



c. Silençage par ingestion de virus modifié (*Virus Inducing Gene Silencing* - VIGS)

La stratégie consiste d'abord à choisir un virus commun à la plante et au ravageur et servant de vecteur à l'ARN double brin (ARNdb). La réplication du virus modifié dans la plante hôte permet sa dissémination dans toutes les parties végétales et particulièrement celles consommées par le ravageur. Une fois entré dans son système digestif, ce virus modifié doit franchir la barrière

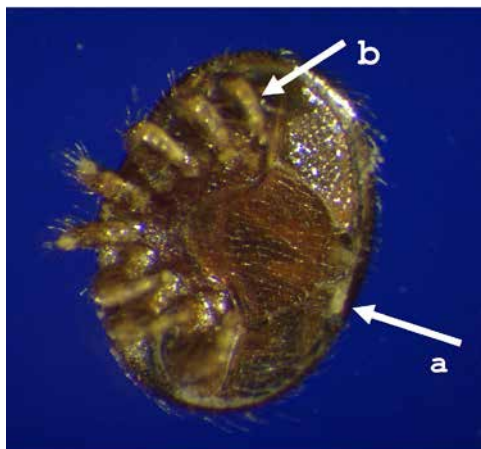
intestinale pour atteindre ses cellules-cibles et s'y répliquer. Au cours de cette phase, l'ARNdb est libéré dans le cytoplasme de la cellule et va dégrader l'ARNm d'une protéine essentielle. Il est évident que le virus candidat ne doit pas être pathogène pour la plante, ce qui restreint les candidatures à trois familles de virus, les *Reoviridae*, *Bunyaviridae* et *Rhabdoviridae*, qui semblent donc avoir un avenir agronomique prometteur (voir revue de Kolliopoulou *et al.*, 2020).

Premiers essais en laboratoire sur *Varroa destructor*, technique SIGS

Le but est de réduire la synthèse d'une enzyme impliquée dans la dégradation des acaricides, la glutathione-S-transférase, surexprimée chez les acariens résistants qu'ils soient nuisibles aux animaux ou aux végétaux. Après injection d'ARN double brin dans l'hémolymphe du parasite, la concentration d'ARN messager pilotant la synthèse de l'enzyme baisse de l'ordre de 30 fois. Les acariens injectés pourraient ainsi redevenir sensibles aux acaricides. Une application par pulvérisation est envisagée par les auteurs (Campbell *et al.*, 2010).

FIGURE 5. Les deux sites d'injection d'ARN double brin chez *V. destructor* (Campbell *et al.*, 2010)

Plus récemment, la faisabilité d'un traitement par ARN interférent contre le parasite et contre les virus de l'abeille est en cours d'évaluation par le laboratoire de recherche-développement Biodirect appartenant à la société Monsanto.



Quelques questionnements à propos des ARN interférents

Sur le fonctionnement cellulaire

Selon le document de l'OCDE (2023), les interrogations majeures, inhérentes au silençage des gènes sont :

- l'inactivation d'ARNm non-cibles ;
- l'utilisation du brin passager au lieu du brin guide de l'ARNi ;
- l'intrusion d'une trop forte charge en ARNi d'origine exogène détournant la machinerie cellulaire aux dépens de la synthèse de miARN ;
- la durée du silençage dans les tissus et organes.

Sur l'utilisation agronomique

Les Coléoptères (scarabées ravageurs) répondent très bien à la technologie ARNi alors qu'une grande variété dans la réponse est observée chez les Hémiptères (puçerons, sauterelles, punaises), Diptères (mouches et moustiques), Lépidoptères (papillons ravageurs diurnes et nocturnes) et Hyménoptères. Des différences sont aussi notées à l'intérieur d'une espèce, entre les différentes étapes de la vie, et même entre tissus et gènes (voir Christiaens *et al.*, 2020). La résistance naturelle au mécanisme d'interférence ARN semble avoir été une des facettes de l'évolution des espèces, ce qui mène à un questionnement sur l'acquisition de résistance après traitement.

Sur l'impact écologique

Deux points importants sont à considérer : la diffusion des ARNdb dans l'environnement et particulièrement

ceux formulés en nanoparticules et les effets sur les espèces non-cibles.

Les mécanismes de diffusion dans l'environnement sont en grande partie les mêmes que ceux des pesticides. Quant aux effets sur les espèces non-cibles, les essais de SmartStax Pro concluent à leur absence, mais comme le souligne le document OCDE (2023), il serait hasardeux de projeter cette première évaluation à des futures constructions d'ARNdb.

Dans le cas particulier des abeilles, le transfert d'ARNdb polluant le nectar ou le pollen serait théoriquement réalisable entre adultes mais impossible par le nourrissage des jeunes larves, du fait du pouvoir inhibiteur de la gelée royale.

Sur la santé des Vertébrés

Théoriquement, le détournement de la machinerie cellulaire pour la fabrication d'ARNi et une stimulation immunitaire inopportune sont possibles, mais aucune preuve n'en a été apportée à ce jour chez des consommateurs de plantes ainsi modifiées (voir document OCDE, 2023).

Et demain ?

L'inhibition de la synthèse d'une protéine par ARN interférent ou silençage d'un gène est issue d'une technique de génie génétique, visant à rendre inefficace son ARN messager. Le détournement du message est dû à une construction artificielle : l'ARN double brin en fait une copie de l'ARNm, partiellement inexacte.

À l'avenir, le codage en ADN de cet ARNdb pourrait être ajouté à un génome végétal ou animal. Le conditionnel est justifié car la balance profits-risques n'est pas encore complètement évaluée dans l'éventualité d'une utilisation à grande échelle, selon l'OCDE.

Comment évaluer la persistance et la diffusion dans l'environnement de ces modifications génétiques, à court et surtout à long terme ? La décision finale reposera-t-elle uniquement sur des critères scientifiques et agronomiques sans considération de bioéthique ?

Bibliographie

Campbell E., Budge G., Bowman A., 2010, « Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase », *Parasites & Vectors* n° 3, article n° 73.

Christiaens O, Whyard S, Vélez AM et Smagghe G., 2020, « Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests : Current Status and Challenges », *Frontiers in Plant Science*, Vol. 11, article n° 451.

Fattal E., 2020, « Stratégies thérapeutiques pour l'application clinique des ARN interférents », *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, Vol. 204 (9), p. 1088-1097.

Kaleem Ullah R.M., Gökçe A., Bakhsh A., Salim M., Wu H.Y., Naqqash M.N., 2022, « Insights into the use of eco-friendly synergists in resistance management of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera : Chrysomelidae) », *Insects*, Vol. 13 (9).

Karimi H. Z. et Innes R.W., 2022, « Molecular mechanisms underlying host-induced gene silencing », *The Plant Cell*, Vol. 34 (9).

Kolliopoulou A., Kontogiannatos D. and Swevers L. (2020) The use of engineered plant viruses in a trans-kingdom silencing strategy against their Insect vectors. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 11, article n° 917.

OCDE (OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development), 17 mars 2023, « Considerations for the environmental risk assessment of the application of sprayed or externally applied ds-RNA-based pesticides », à lire sur www.oecd.org. ●