

Évaluation des risques environnementaux dus aux ARN répresseurs

Hervé SEITZ | Herve.Seitz@igh.cnrs.fr

CNRS - Institut de génétique humaine - Montpellier

Mots clés : ARN double-brin, MicroARN, milieu aquatique, perturbateur biologique, xenomiR

Parmi les mécanismes biologiques qui régulent l'expression des gènes, la communauté scientifique a découvert il y a une vingtaine d'années deux modes de régulation impliquant les acides ribonucléiques (ARN). D'une part, des ARN endogènes, appelés «microARN», qui sont des répresseurs de gènes-cibles spécifiques, et qui existent chez tous les organismes animaux et végétaux où ils ont été recherchés. Une technique de détection extrêmement sensible, le «small RNA-Seq»*, permet facilement de les détecter. D'autre part, les longs ARN double-brin*, qui ont la capacité de déclencher la répression de gènes-cibles spécifiques dans une grande variété d'espèces (animaux, plantes, champignons). Cette propriété des ARN double-brin, et leur spécificité, semble permettre le développement de nouveaux insecticides, dont la toxicité serait restreinte à quelques insectes ciblés : des ARN double-brin qui réprimerait des gènes indispensables à la survie de l'insecte permettraient en théorie de le tuer, sans affecter les autres espèces vivantes. Étant donné que des résistances aux insecticides conventionnels apparaissent dans les populations d'insectes (voir <https://www.anses.fr/fr/glossaire/661>), il est en effet important de renouveler les substances actives disponibles. Ces concepts soulèvent de nouvelles questions en matière de risque environnemental :

1) une étude de 2012 a montré la détection de microARN de riz dans des échantillons biologiques animaux. Ce travail, qui suggérait que des microARN présents dans la nourriture pouvaient résister à la digestion, passer dans le sang et atteindre des organes-cibles chez l'animal, a conclu que des régulateurs de l'expression des gènes pouvaient venir perturber l'expression des gènes de l'animal, soulevant des craintes quant à l'existence d'un nouveau type de perturbateur, d'origine biologique.

2) puisque des insecticides à base d'ARN double-brin sont en cours de développement, il est nécessaire de mesurer la persistance de l'ARN double-brin dans le milieu naturel.

Deux articles récents ont exploré ces questions de façon rigoureuse, en investiguant les origines possibles de la détection de microARN de plantes dans des échantillons animaux (réalité biologique, ou artefact technique); et en mesurant la vitesse de dégradation de l'ARN double-brin dans le milieu aquatique.

L'analyse de plus de 800 jeux de données issus de tissus et de fluides biologiques humains révèle que les xenomiR sont probablement des artefacts expérimentaux.

Kang W. et al. (2017). Survey of 800+ datasets from human tissue and body fluid reveals XenomiRs are likely artifacts. RNA, vol. 23(4): p.433-445

Résumé

On appelle «xenomiR» les microARN provenant d'une autre espèce que l'espèce étudiée (par exemple, des microARN de riz détectés dans un échantillon de sang humain (1)). Afin de déterminer l'origine des xenomiRs (réel apport de la nourriture, ou erreur expérimentale due à une méthode de détection trop sensible et/ou trop imprécise), les auteurs de cet article ont compilé de nombreux jeux de données de small RNA-Seq à partir d'échantillons humains, issus de laboratoires indépendants. Ces 824 jeux de données proviennent de divers organes (foie, cerveau, ...), ou de fluides biologiques (sang, plasma, ...) humains.

Des hypothèses discriminantes ont été formulées et testées successivement :

1) Étant donné que les nutriments, issus de l'alimentation, passent dans le sang avant d'être distribués dans tout

l'organisme, des xenomiRs qui seraient issus de l'alimentation devraient être plus abondants dans le sang que dans les organes éloignés du tube digestif. Effectivement, les xenomiRs sont détectés dans 17% des échantillons issus d'organes humains et dans 69% des échantillons de fluides biologiques. Cette observation pourrait suggérer que les xenomiRs sont d'origine alimentaire. Cependant leur abondance reste très faible dans chaque échantillon (0,001 % des microARN détectés), ce qui est peu compatible avec un effet perturbateur sur l'expression des gènes (seuls les microARN les plus abondants semblent actifs (2)). D'autre part, la méthode d'analyse des fluides biologiques est différente de celle des organes, puisqu'elle requiert une étape d'amplification du signal, connue pour enrichir les échantillons en contaminants extérieurs.

2) Les organes du tube digestif, ou en contact avec lui, devraient contenir davantage de xenomiRs alimentaires que les organes les plus éloignés. Mais les cellules les plus exposées aux apports nutritionnels (cellules du foie et cellules sanguines) ne sont pas plus riches en xenomiRs que les cellules du cerveau, qui en sont plus isolées.

3) S'ils sont issus de l'alimentation, les xenomiRs devraient venir d'espèces animales ou végétales abondantes dans l'alimentation. Les xenomiRs observés proviennent

essentiellement d'insectes et de Rongeurs. Ces animaux ne constituent pas une source d'alimentation notable chez l'Homme, spécialement aux États-Unis (où ont été prélevés les échantillons les plus riches en xenomiRs de Rongeurs). Les xenomiRs proviennent rarement d'espèces qui contribuent le plus à l'alimentation humaine (céréales, Oiseaux, Poissons, ...).

4) S'ils sont issus de contaminations expérimentales, ils devraient être similaires entre les jeux de données issus d'un même laboratoire. Les auteurs s'aperçoivent en effet que les échantillons issus d'un même laboratoire sont les plus semblables entre eux, ce qui suggère une contamination spécifique du matériel de laboratoire.

5) Des xenomiRs d'origine alimentaire devraient dépendre du régime alimentaire. Des rats (nourris au riz ou aux pommes de terre) et des porcelets (nourris au lait de vache ou au lait de truie et au maïs) ne présentent pas de différence d'abondance de xenomiRs de ces différentes sources.

Les auteurs concluent que l'observation de xenomiRs, quand elle a lieu, est due à une contamination expérimentale plutôt qu'à une réalité biologique. Le seul test expérimental qui pourrait conforter l'origine alimentaire des xenomiRs (le test de l'hypothèse n°1) peut s'expliquer par les particularités techniques de la détection des microARN dans les fluides biologiques. Les quatre autres tests, dénués de ce genre d'ambiguïté, suggèrent quant à eux une origine artificielle, par contamination de l'équipement des laboratoires.

Commentaire

Cet article propose une vérification rigoureuse des deux hypothèses sur l'origine de l'observation des xenomiRs. Leurs résultats semblent clairement exclure la possibilité que des microARN issus de l'alimentation soient responsables de cette observation. La grande sensibilité du small RNA-Seq semble en revanche pouvoir expliquer que des contaminants (microARN issus d'une espèce étudiée pour une autre expérience dans le même laboratoire) deviennent détectables dans des échantillons, spécialement s'il s'agit d'échantillons de fluides biologiques. Les conclusions de cet article semblent donc éliminer la possibilité que des microARN d'origine alimentaire parviennent à survivre aux conditions du tube digestif, à passer dans le sang et à atteindre des organes-cibles pour en perturber l'expression des gènes.

Dissipation de l'ARN double-brin dans les écosystèmes aquatiques.

Albright VC. et al. (2017). Dissipation of double-stranded RNA in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem*, vol. 36(5) : p.1249-1253

Résumé

Puisque l'ARN double-brin peut déclencher la répression de gènes-cibles, des insecticides de nouvelle génération, à base d'ARN double-brin spécifiques de gènes d'un insecte particulier, pourraient être développés. Des efforts de recherche en ce sens ont été initiés, pour évaluer la toxicité

et la spécificité des ARN double-brin sur les insectes-cibles (3). Si effectivement l'ARN double-brin vient à être utilisé en agriculture (soit pulvérisé sur les champs, soit exprimé par des plantes transgéniques), la question de sa persistance dans l'environnement se posera. Les auteurs de cette étude ont donc évalué la persistance d'ARN double-brin dans le milieu aquatique (en analysant séparément la colonne d'eau et les sédiments). Ils montrent que l'ARN double-brin est dégradé rapidement, il est non détectable au bout de 96 heures dans la colonne d'eau (qu'il s'agisse d'eau purifiée, d'eau de mare stérilisée, ou d'eau de mare non stérilisée) ; il pénètre très peu dans les sédiments (détecté seulement au bout de 168 heures et à des niveaux très faibles), et en disparaît en 24 heures. Les auteurs concluent que l'ARN double-brin persiste très peu dans le milieu aquatique, et que son usage en agriculture présente peu de risques d'impact environnemental à long terme.

Commentaire

Le résultat de cette étude (la faible persistance de l'ARN double-brin dans le milieu aquatique) est conforme aux attentes théoriques, étant donnée la faible stabilité biochimique de l'ARN de manière générale – mais il était important de le mesurer expérimentalement dans des conditions imitant le milieu naturel de façon réaliste, ce qui a été fait ici. Les choix méthodologiques sont parfois un peu curieux, et des études complémentaires, basées sur des techniques plus communes et bien maîtrisées par la communauté, seront nécessaires pour confirmation : la purification de l'ARN à partir d'échantillons (ici par digestion à la protéinase K, dont on peut douter de l'efficacité dans un échantillon d'eau de mare ou de sédiments) gagnerait à être améliorée ; la détection de l'ARN, par une méthode nouvelle et relativement peu utilisée, serait plus convaincante si elle était basée sur une technique plus éprouvée (qPCR* ou RNA-Seq).

Les auteurs soulignent aussi que la nature des sédiments pourrait modifier le partitionnement de l'ARN double-brin entre la colonne d'eau et les sédiments (les échantillons utilisés dans cette étude étaient riches en sable ; un sol riche en argile pourrait capturer davantage d'ARN double-brin). Il s'agit donc d'un travail pionnier, qui méritera d'être confirmé et généralisé à d'autres natures de milieux aquatiques et de sédiments. En l'état, il suggère que l'ARN double-brin présente peu de risque de persistance à long terme dans l'environnement.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces deux articles explorent de nouvelles sources théoriques de risque environnemental, suggérées par le développement de nos connaissances sur la régulation des gènes par les ARN. Premièrement, la détection, dans des échantillons biologiques d'une espèce A, de microARN issus d'une espèce B, pouvait suggérer que les microARN pourraient se comporter en perturbateurs de l'expression des gènes, d'origine biologique. L'analyse menée par Kang et al. semble au contraire exclure cette possibilité : les cas précédemment rapportés sont apparemment dus à une contamination du matériel de détection dans le laboratoire. Ce travail indique donc que les microARN issus de l'environnement ne résistent pas aux conditions biochimiques du tube digestif, et qu'ils n'ont donc pas la possibilité d'atteindre des cellules-cibles dont ils perturberaient l'expression des gènes. Deuxièmement, Albright et al. montrent que l'ARN double-brin a une faible persistance dans le milieu aquatique. Des insecticides à base d'ARN double-brin sont actuellement en cours de développement dans l'agro-industrie ; s'ils venaient à être effectivement utilisés dans l'agriculture, il est probable qu'ils se dégradent très rapidement dans le milieu naturel. Il sera, en revanche, nécessaire de réaliser les mêmes mesures sur les produits effectivement proposés par l'industrie, dont il faut s'attendre à ce qu'ils soient modifiés chimiquement pour améliorer leur stabilité biochimique : il faut prévoir que de telles modifications, si elles sont mises en œuvre, augmentent la persistance des ARN double-brin dans l'environnement.

GENERAL CONCLUSION

These two articles explore two novel theoretical sources of environmental risk, as suggested by the development of our knowledge on gene regulation by RNA. Firstly, the detection of microRNAs from species B in biological samples of species A may suggest that microRNAs could behave as biological perturbors of gene expression. The analysis by Kang et al. appears to exclude that possibility: previously reported examples were apparently due to the contamination of laboratory detection equipment. That study thus indicates that microRNAs from the environment do not resist biochemical conditions of the digestive track, therefore they cannot reach target cells where they would perturb gene expression.

Secondly, Albright et al. show that double-stranded RNA has a weak persistence in aquatic microcosms. Novel insecticides, based on double-stranded RNA, are currently under development in the industry; if they were to be used in agriculture, it is likely that they will degrade rapidly in the natural environment. Yet it will be necessary to perform the same measurements on the products actually offered by the industry, which will probably be chemically modified to improve their biochemical stability: it can be expected that such modifications would increase the persistence of double-stranded RNA in the environment if they are implemented.

Lexique

ARN double-brin : deux molécules d'ARN peuvent s'apparier et former une double hélice (de structure très similaire à celle de la double hélice d'ADN). Le complexe bimoléculaire ainsi obtenu est appelé «ARN double-brin».

qPCR : méthode de détection très sensible, spécifique d'une séquence d'ADN ou d'ARN choisie.

Small RNA-Seq : méthode de détection à haut débit des petits ARN, dont la grande sensibilité permet de mesurer l'abondance d'ARN très peu exprimés.

Publications de référence

1 Zhang L, Hou D, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 2012;22 (1):107-26.

2 Mullokandov G, Baccharini A, et al. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat Methods* 2012;9(8):840-6.

3 Ahmad A, Negri I, et al. Transportable data from non-target arthropod field studies for the environmental risk assessment of genetically modified maize expressing an

insecticidal double-stranded RNA. *Transgenic Res*
2016;25(1):1-17.

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.