
FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

MODULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES PAR RdDM

Présentation générale de la technique (Grand public)

Certains ARN cellulaires agissent par un mécanisme appelé l'interférence induite par les ARN. Ce mécanisme physiologique initialement découvert chez un nématode modèle (petit ver retrouvé dans le sol) et chez les plantes, a été identifié dans la majorité des règnes, y compris les mammifères.

L'interférence ARN est un phénomène par lequel une molécule d'ARN, généralement de petite taille, établit une liaison avec une autre molécule d'acide nucléique ou un complexe de protéines et d'acides nucléiques (ADN ou ARN) afin d'en modifier l'activité, le plus souvent par inhibition. Ces mécanismes sont naturels et ont une fonction de régulation cellulaire.

La RdDM (*RNA-dependent DNA Methylation*) est le mécanisme cellulaire qui utilise de petits ARN interférents (siRNA) pour modifier l'expression de gènes par méthylation d'une séquence spécifique d'ADN, sans modifier sa séquence nucléotidique. C'est ce que l'on appelle un changement dit épigénétique. La technique de la RdDM, qui utilise ce mécanisme naturel, permet en particulier d'éteindre l'expression d'un gène spécifique. L'extinction du gène obtenue par méthylation peut être transmise à la descendance sur plusieurs générations, elle finit le plus souvent par être perdue.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

La méthode de méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN ou RdDM (RNA-dependent DNA methylation) permet de moduler l'expression d'un ou plusieurs gènes de manière ciblée. Elle s'effectue grâce à l'utilisation d'un ARN double-brin (dsRNA) qui par maturation donnera l'ARN interférent. Pour cela, on introduit la séquence spécifique soit sous la forme d'un transgène ADN qui exprime un ARN contenant les séquences de deux brins complémentaires, correspondant à la séquence régulatrice ciblée, jointes bout à bout en « épingle à cheveux » (hairpin) ou directement sous forme d'ARN au moyen d'un virus (VIGS pour virus-induced gene silencing) (Bond and Baulcombe, 2015). Ceux-ci qui induisent la méthylation des séquences régulatrices (Matzke and Mosher, 2014). Si ces ARN interférents reconnaissent un promoteur, ils peuvent spécifiquement induire sa méthylation et induire l'extinction du gène contrôlé par ce promoteur (inhibition de la transcription du gène). Une fois induite,

la méthylation peut être stable sur plusieurs générations en l'absence de l'ARN double brin, l'expression du gène peut aussi ne jamais être restaurée complètement.

Utilisations possibles

Les objectifs recherchés sont divers et concernent tous les organismes, des unicellulaires aux eucaryotes supérieurs (plantes et animaux), à titre d'exemple et sans limite :

- Lutte anti-virale, anti-bactérienne, anti-parasitaire...
- Inactivation de gènes (pour la compréhension de phénomènes physiologiques ou pour induire des modifications métaboliques).

Modalités de mise en œuvre

Le transfert des ARN interférents est un point clé de leur utilisation :

- Les ARN interférents obtenus par synthèse chimique sont administrés sous forme de complexes avec des molécules permettant leur entrée cellulaire. La durée de l'effet de ces ARN dépend de la cible et de la stabilité des ARN transférés. Le plus souvent, l'effet est transitoire et nécessitera d'éventuelles ré-administrations.
- Les ARN interférents exprimés en cellule peuvent, selon le mode choisi, avoir une expression prolongée, par intégration du vecteur dans les cellules ciblées, ou transitoire, mais plus durable que celle obtenue par transfert d'ARN. Les vecteurs utilisés sont très nombreux : plasmides ou vecteurs viraux.
- Selon le mode de vectorisation, les utilisations pourront avoir lieu *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo* (plantes entières ou organes spécifiques).
- Chez les plantes, l'extinction de gène par méthylation de l'ADN est généralement réalisée par transgène, avec une construction codant des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA). Par l'obtention d'un ségrégant négatif (Voir fiche), il est possible d'obtenir une plante ne comportant plus le transgène tout en conservant la modification de méthylation de la plante OGM mère. La stabilité de cette modification est variable.
- Une méthode permettant une administration directement sous forme d'ARN au moyen d'un virus (VIGS pour virus-induced gene silencing) a été mise au point dernièrement (Bond and Baulcombe, 2015)

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Il n'y a pas de modification de séquence. La limite de cette technique pour certaines applications pourrait être que les changements épigénétiques désirés disparaissent, sans que la durée d'action ne soit prédictible. Cette extinction peut aussi être considérée comme un avantage si l'effet recherché est transitoire.

Détection (après élimination de la molécule d'ARN responsable de la modification)

La modification est-elle détectable dans les plantes porteuses de la modification et leurs produits ?

Les méthylations de l'ADN obtenues chez les plantes modifiées par le RdDM sont traçables par des méthodes de séquençage particulières (après traitement au bisulfite).

Peut-on identifier la modification et la technique ayant donné lieu à la cette modification dans la plante porteuse de la modification et ses produits ?

Sans documentation de la modification, dans l'état actuel des connaissances sur la méthylation et déméthylation des bases, il est impossible de différencier une plante obtenue par RdDM d'une plante obtenue par sélection classique. Bien que la modification soit visible, elle ne pourra être imputée à une modification par cette technique.

Avec une documentation de la modification il sera possible de suivre la modification.

Si une détection est possible, est-elle applicable dans le cadre d'une recherche de présence fortuite en situation de mélange plus ou moins complexe au cours du processus de production, de transformation et de distribution ?

Il n'est pas possible en cas de présence fortuite, de déterminer de façon formelle l'origine des épimutants (issus de technique RdDM ou de variation(s) épigénétique(s) naturelle(s)).

Dans le cas où une documentation de la modification permet une recherche d'une éventuelle présence, des techniques pourraient être développées, mais il n'est pas clair que leur seuil de sensibilité puisse atteindre 0.1% ou même 0.9%.

Bien qu'il soit maintenant possible de déterminer le *méthylome* complet d'un génome connu par séquençage à haut débit (Cortijo et al., 2014; Urich et al., 2015), le coût actuel de la technique semble cependant prohibitif pour un usage en routine.

Bibliographie

Bobbin, M.L., Burnett, J.B., Rossi, J.J. (2015). RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection Genome Med. 7(1): 50.

Bond, D.M., and Baulcombe, D.C. (2015). Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 917–922.

Cortijo, S., Wardenaar, R., Colomé-Tatché, M., Johannes, F., and Colot, V. (2014). Genome-wide analysis of DNA methylation in Arabidopsis using MeDIP-chip. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1112, 125–149.

Matzke, M.A., and Mosher, R.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nat. Rev. Genet. 15, 394–408.

Urich, M.A., Nery, J.R., Lister, R., Schmitz, R.J., and Ecker, J.R. (2015). MethylC-seq library preparation for base-resolution whole-genome bisulfite sequencing. Nat. Protoc. 10, 475–483.