

Recherche et caractérisation de nouveaux ARN non codant (ARNnc) chez *Pyrococcus abyssi*

Kounthéa Phok

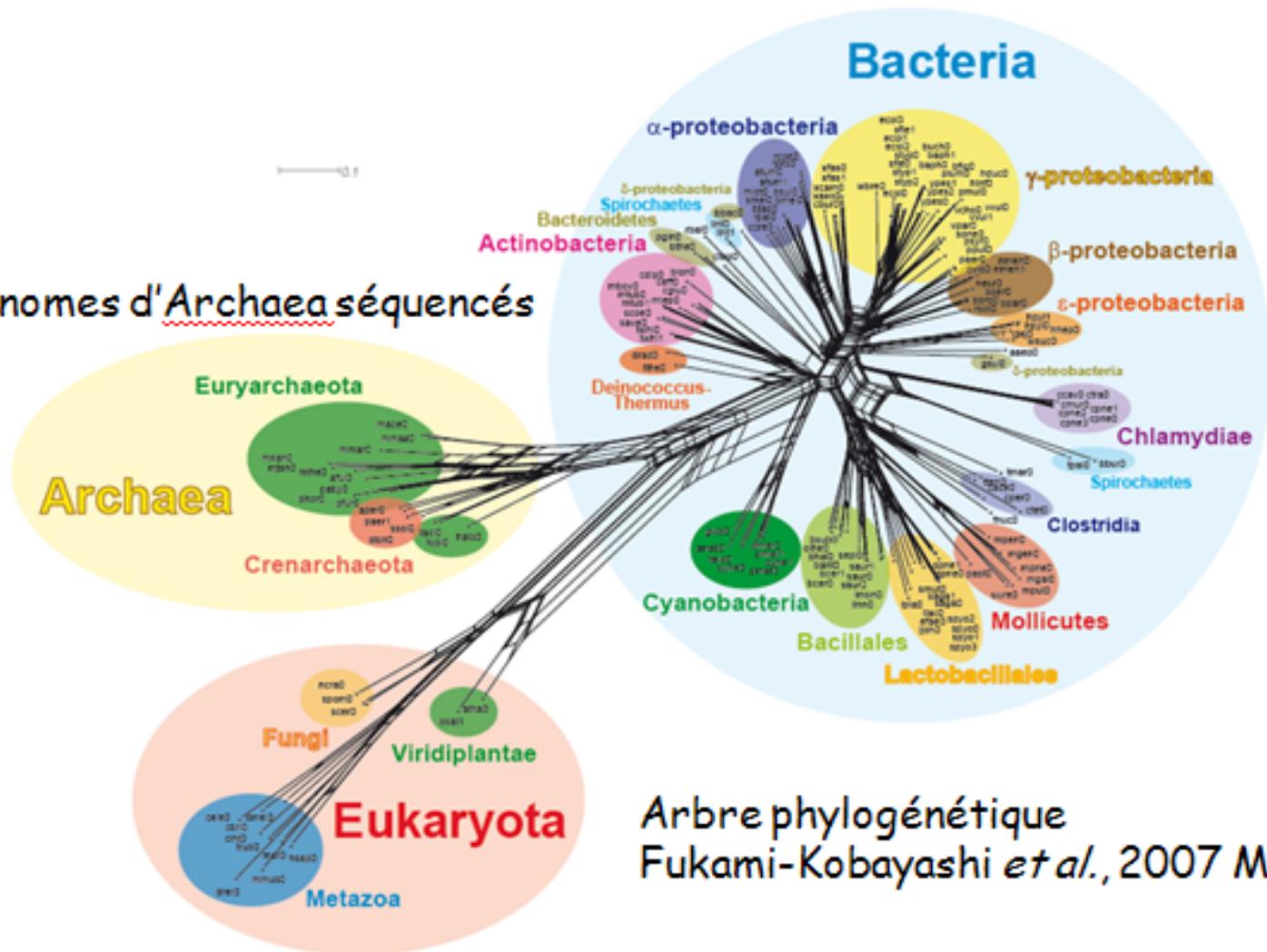
Béatrice Clouet d'Orval
Equipe AJ Carpousis
LMGM
UMR5100 UPS-CNRS

Christine Gaspin et Annick Moisan
LBIA
UR INRA



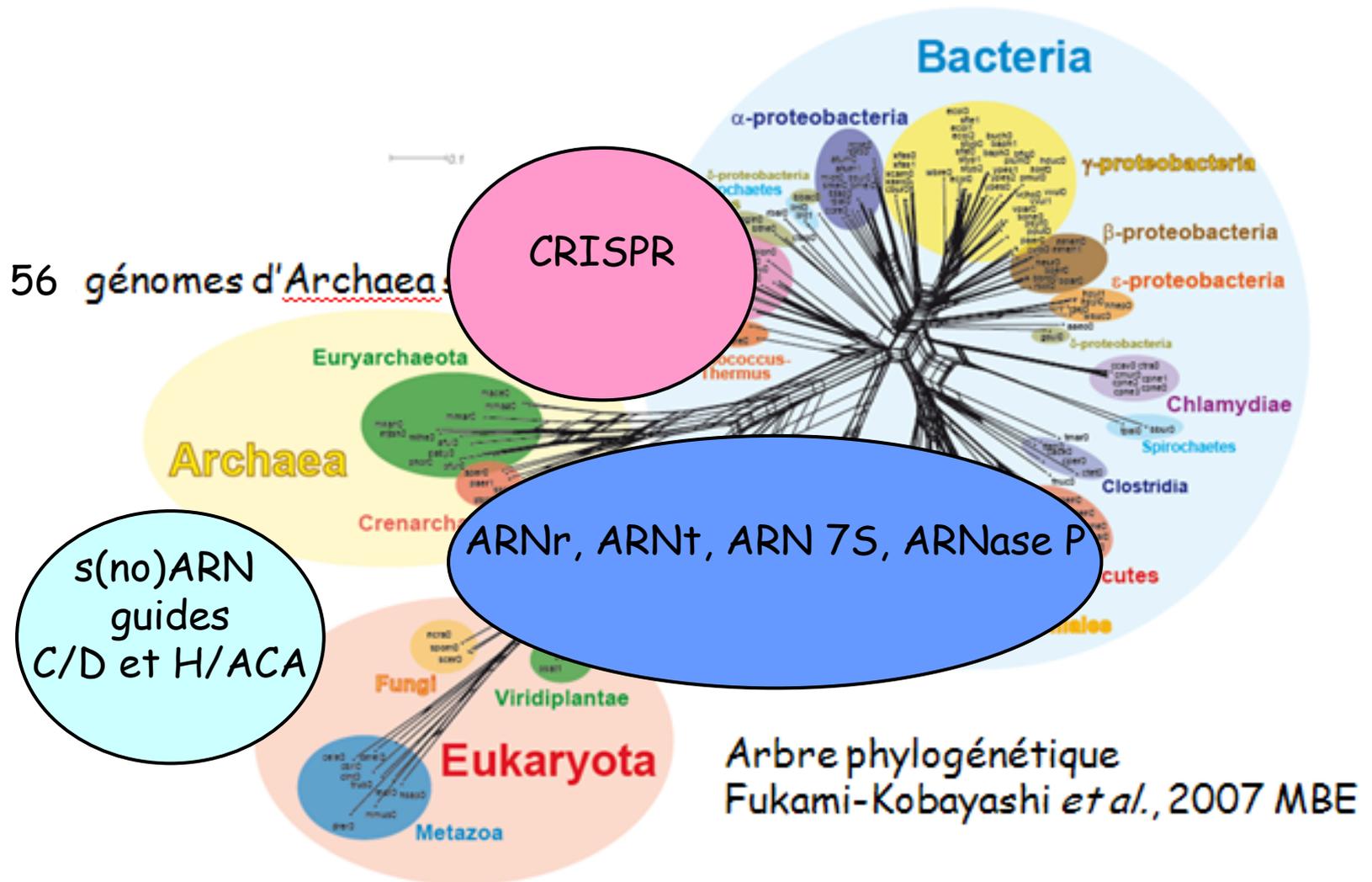
Les Archaea

56 génomes d'Archaea séquencés



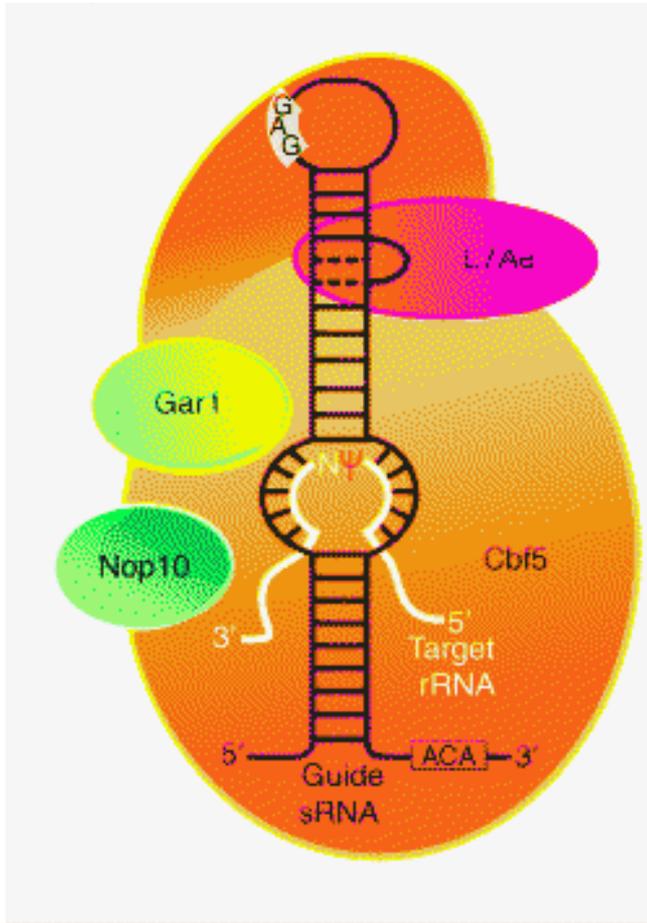
Arbre phylogénétique
Fukami-Kobayashi *et al.*, 2007 MBE

Les ARNnc connus chez les Archaea



Les ARNnc connus chez Archaea

Les sARN guides à boîte H/ACA

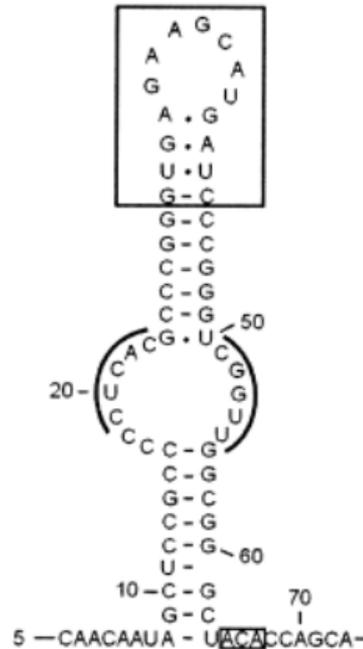
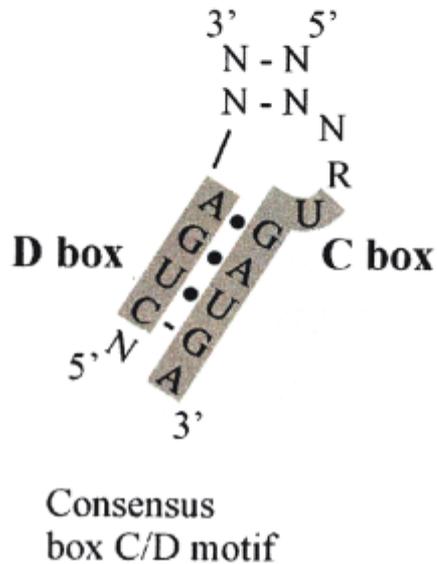


- Homologues aux snoARN H/ACA eucaryotes
- Protéines associées = α CBF5, α NOP10, L7Ae, α GAR1 \Rightarrow Pseudouridylation des ARNt et ARNr
- Poche de pseudouridylation

Les ARNnc connus chez Archaea

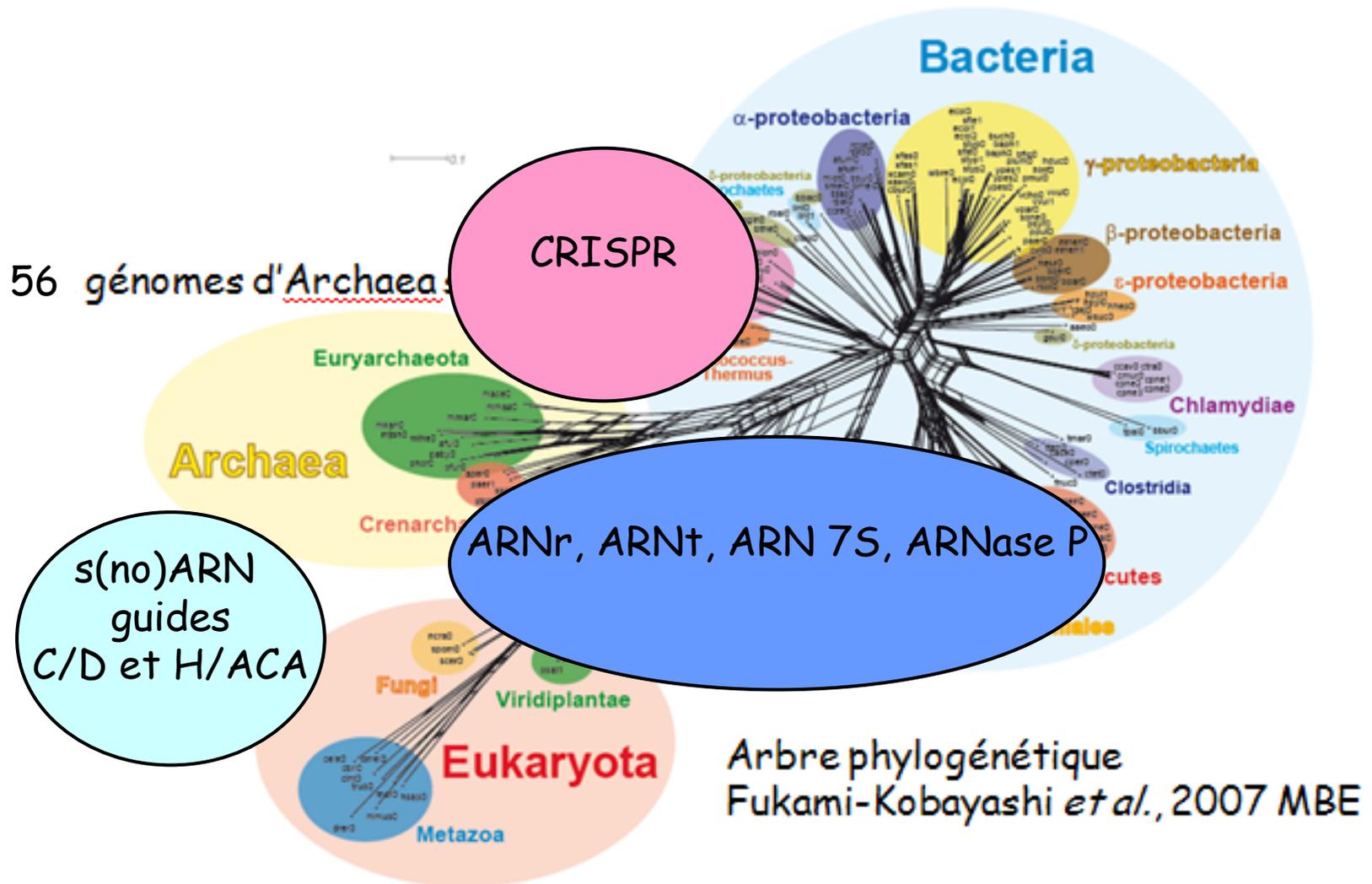
Les sARN guides à boîte C/D et H/ACA :

K-Turn/K-loop : motif de liaison à L7Ae

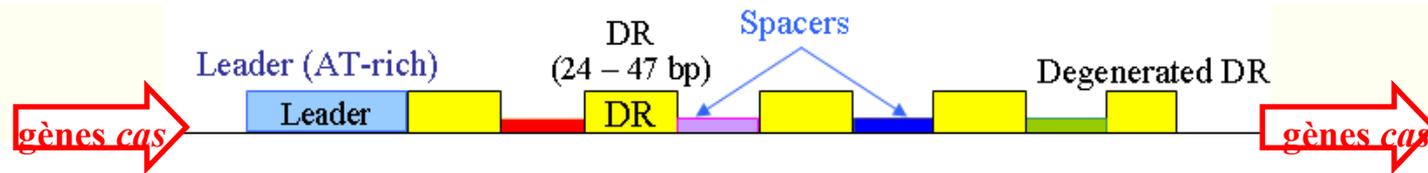


- Structure dynamique stabilisée en présence de protéine = L7Ae
- boucle asymétrique entourée de 2 hélices
- 2 appariements en ciseaux GA \Rightarrow Trans Hoogsteen/sugar edge
- Courbure de $120^\circ \Rightarrow$ kink
- Nucléotides protubérants en contact avec la protéine

Les ARN chez les Archaea



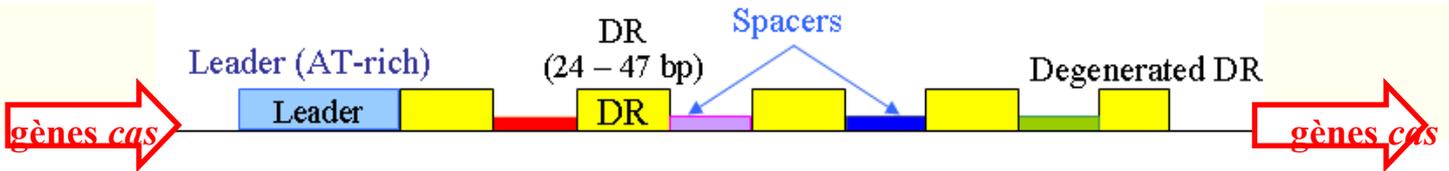
Les ARNnc connus chez Archaea les CRISPR



CRISPR = Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- présents dans ~90% des génomes d'Archaea séquencés et dans 40% des génomes bactériens séquencés
- Séquence Leader commune de 300 à 500 bp
- Multiples séquences répétées (DR) courtes directes de 21 à 37 bp regroupées à un ou plusieurs loci sur le chromosome
- Séquences spacers non-répétées de taille similaire (absente du reste du génome)
- Gènes CAS : CRISPR associated genes
 - Fonctions associées = liaison à l'ARN, Nucléase, Hélicase

Les ARNnc connus chez Archaea les CRISPR



CRISPR = Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- Séquences spacers = ~3% d'origines phagique et plasmidique

⇒ **ARN interférence chez les procaryotes**

- démontré chez *Streptococcus thermophilus*

Pour revue Sorek *et al.*, 2008

- CRISPR & gènes CAS identifiés chez les Archaea : Sulfolobales, Méthanococcales, *Pyrococcus furiosus*

Les ARNnc connus chez Archaea

- *Archaeoglobus fulgidus* : Rnomics (Tang *et al.*, 2002)
- *Sulfolobus sulfataricus* : Rnomics (Tang *et al.*, 2005) ; L7Ae (Zago *et al.*, 2005)

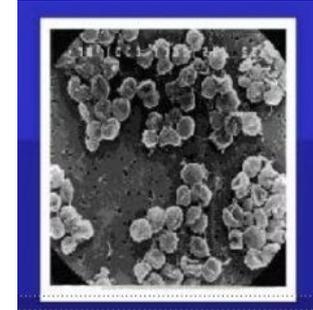
ARNnc de fonction inconnue

- sARN antisens à
 - des transposons
 - des ORF
 - d'autres ARNnc
- sARN codés dans des régions intergéniques
- sARN chevauchant les extrémités 5' et 3' d'ORF

⇒ Nombre de travaux limité dans la recherche de nouveaux ARNnc chez les Archaea

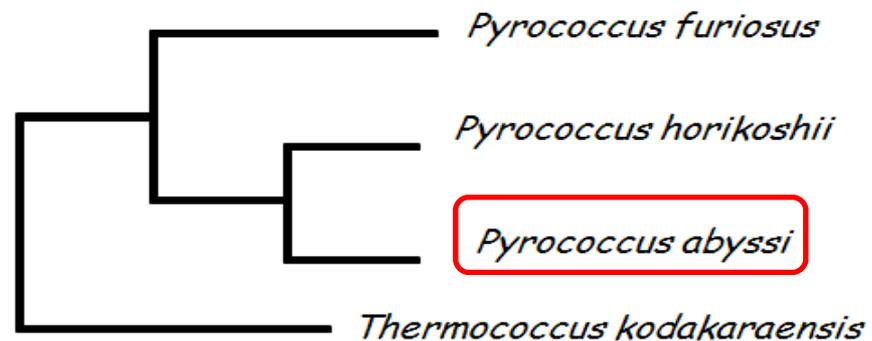
Pyrococcus abyssi & Les Thermococcales

- Organisme modèle du laboratoire
- Archaeon hyperthermophile : 103°C
- Conditions optimales de croissance : 200 ATM, anaérobie stricte
- Génome ~1,77Mb



(Forterre & al., *Mol Microbiol.* 2003 Mar;47(6):1495-512)

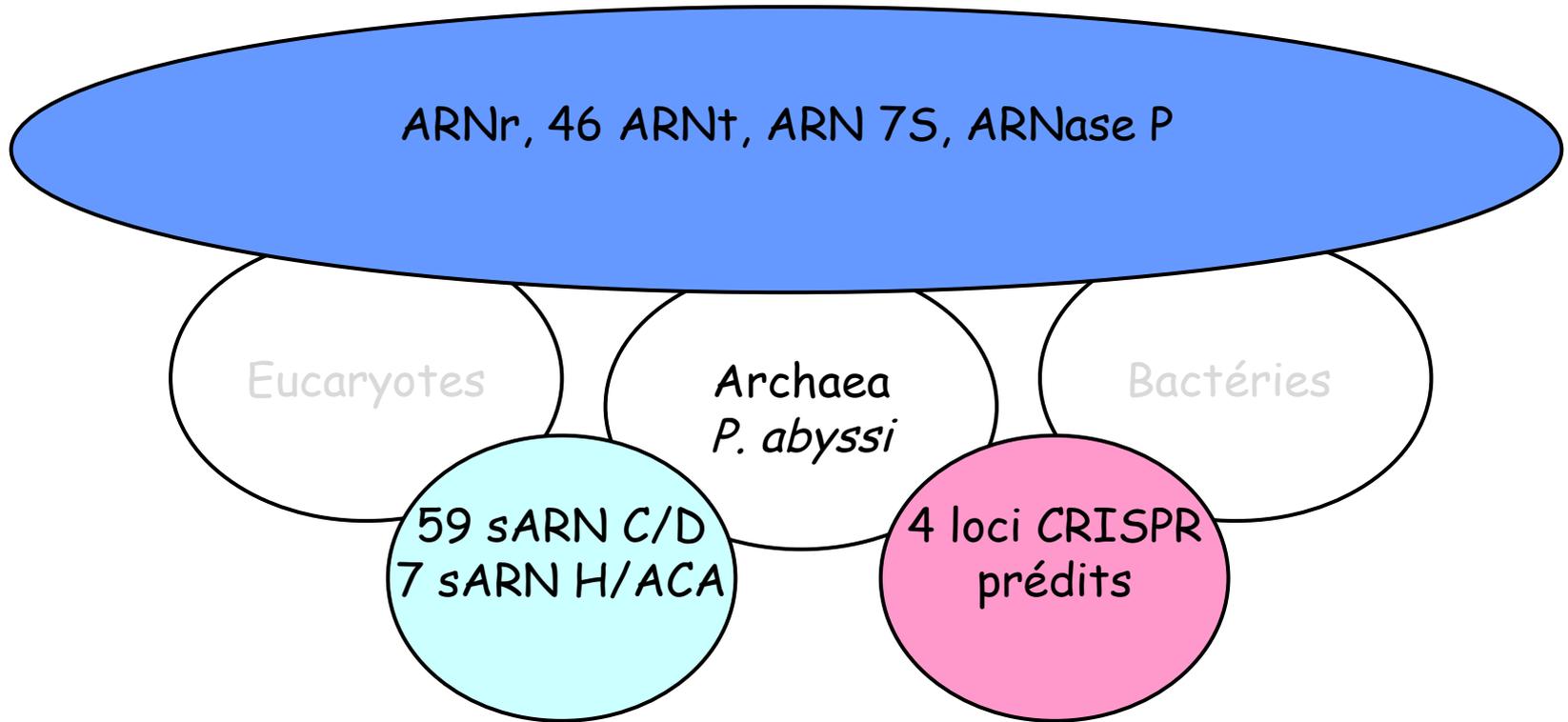
- Chromosome : 1,76Mb, 1993 gènes
- Plasmide pGT5 : 3,5 kb 2 gènes
- Riche en A/T



Arbre phylogénétique de l'ordre des Thermococcales basé sur des alignements multiples de génomes

<http://archaea.ucsc.edu/>

Les ARNnc connus chez *Pyrococcus abyssi*



Existe-il d'autres ARNnc ?

Projet : Approches *in silico* pour identifier de nouveaux ARNnc chez *Pyrococcus abyssi*

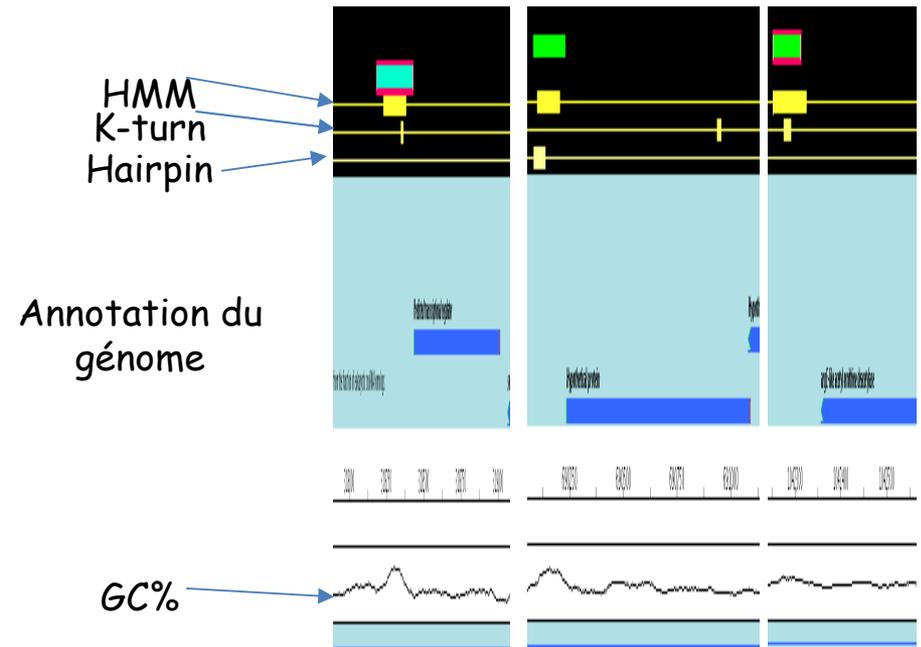
Approche *ab initio*

- Recherche de motifs/structure :
 - K-turn, hairpin
- Biais de composition en nucléotides
 - Modèle de Markov Caché (HMM)
 - GC %
- Energie libre

Analyse comparative RNAsim

- Extraction des régions intergéniques des génomes des 4 Thermococcales
- Wu-BLAST
- QRNA : recherche de régions structurées
- Assemblage multi-génomique : création de composantes connexes

Intégration des données dans
ApolloRNA
et
Sélection de candidats



Approche *ab initio*

Régions intergéniques

- HMM : 74
- Hairpins : 44
- K-Turn : 125
- Energie libre : 254

15 loci candidats

Analyse comparative RNAsim

- *Pyrococcus abyssi* : 113
- *Pyrococcus furiosus* : 131
- *Pyrococcus horikoshii* : 210
- *Thermococcus kodakaraensis* : 125

65 loci candidats

Résultats

Approche *ab initio*

Régions intergéniques

- HMM : 74
- Hairpins : 44
- K-Turn : 125
- Energie libre : 254

15 loci candidats



8 loci candidats

Analyse comparative RNAsim

- *Pyrococcus abyssi* : 113
- *Pyrococcus furiosus* : 131
- *Pyrococcus horikoshii* : 210
- *Thermococcus kodakaraensis* : 125

65 loci candidats



58 loci candidats

7 sARN H/ACA



Résultats

Approche *ab initio*

Régions intergéniques

- HMM : 74
- Hairpins : 44
- K-Turn : 125
- Energie libre : 254

15 loci candidats



8 loci candidats

Analyse comparative RNAsim

- *Pyrococcus abyssi* : 113
- *Pyrococcus furiosus* : 131
- *Pyrococcus horikoshii* : 210
- *Thermococcus kodakaraensis* : 125

65 loci candidats



58 loci candidats

7 sARN H/ACA

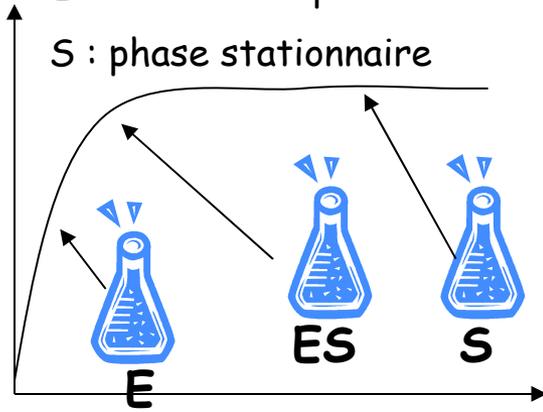
⇒ Validation expérimentale par Northern Blot

Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

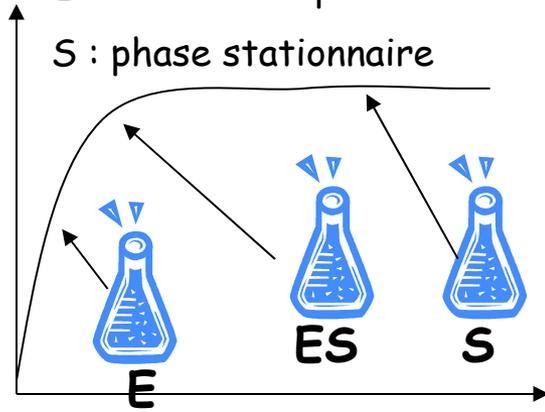


Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

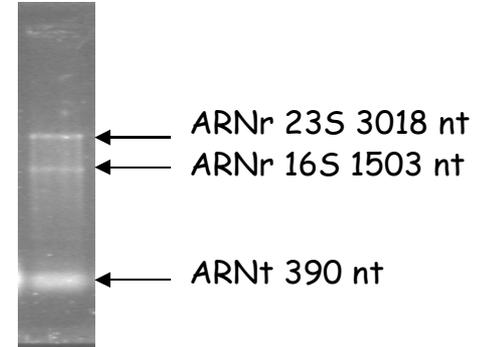


Extraction des ARN totaux



Vérification de la qualité des ARN

Gel agarose 2%

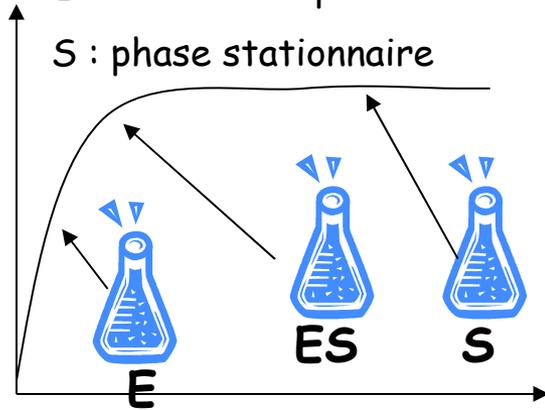


Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire



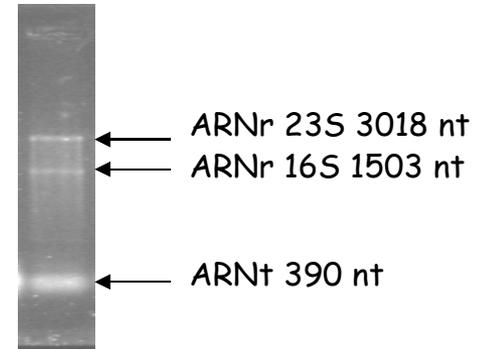
Extraction des ARN totaux

Vérification de la qualité des ARN

Gel agarose 2%

Migration de 10 μg d'ARN totaux +
Marqueur de taille radiomarqué

Gel acrylamide 6%

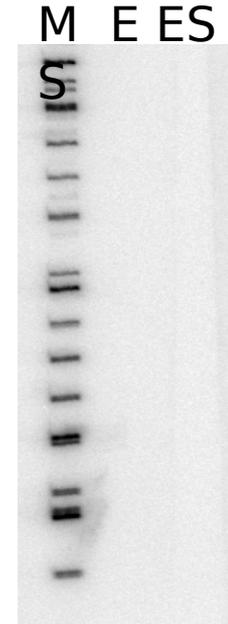
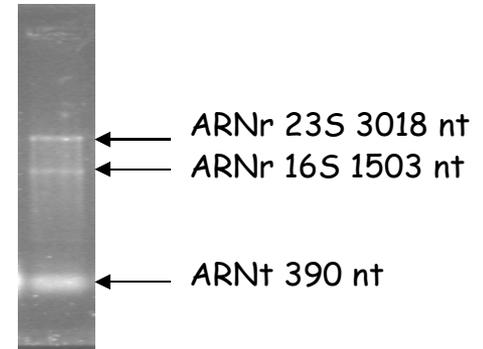
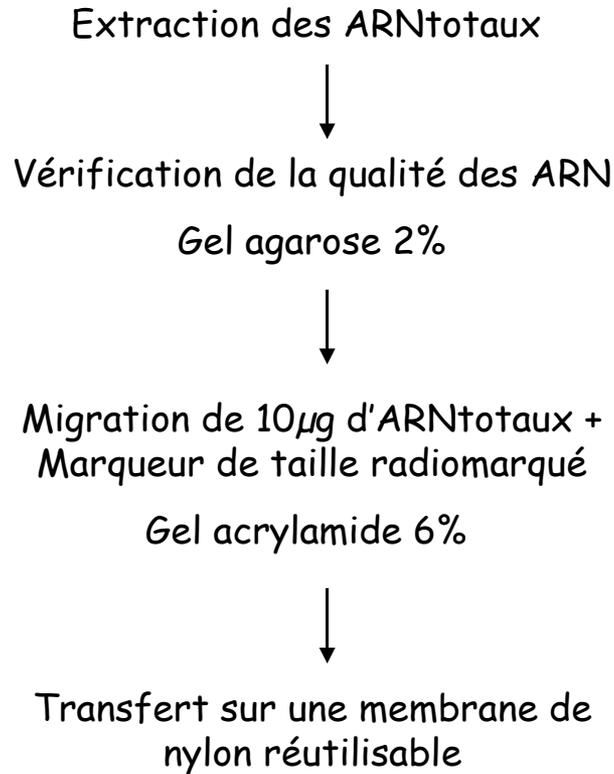
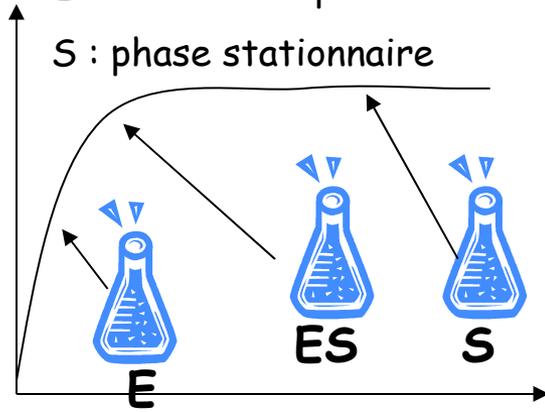


Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

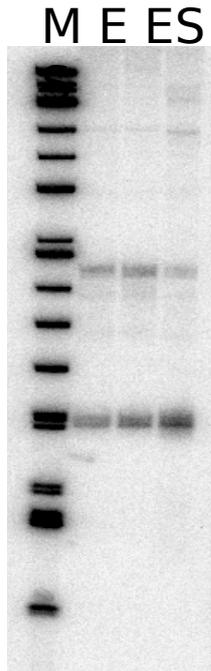
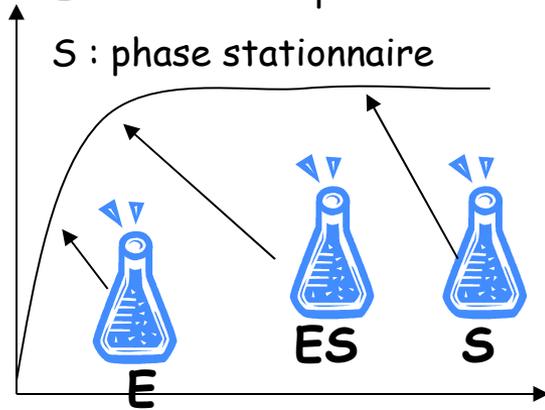


Démarche expérimentale

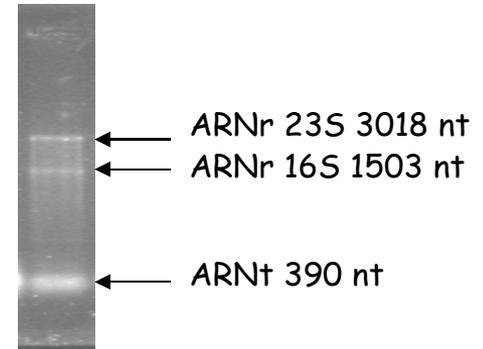
E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

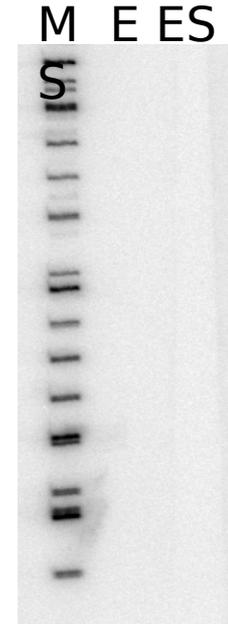
S : phase stationnaire



Extraction des ARN totaux
↓
Vérification de la qualité des ARN
Gel agarose 2%



Migration de 10 μ g d'ARN totaux +
Marqueur de taille radiomarqué
Gel acrylamide 6%



Transfert sur une membrane de
nylon réutilisable

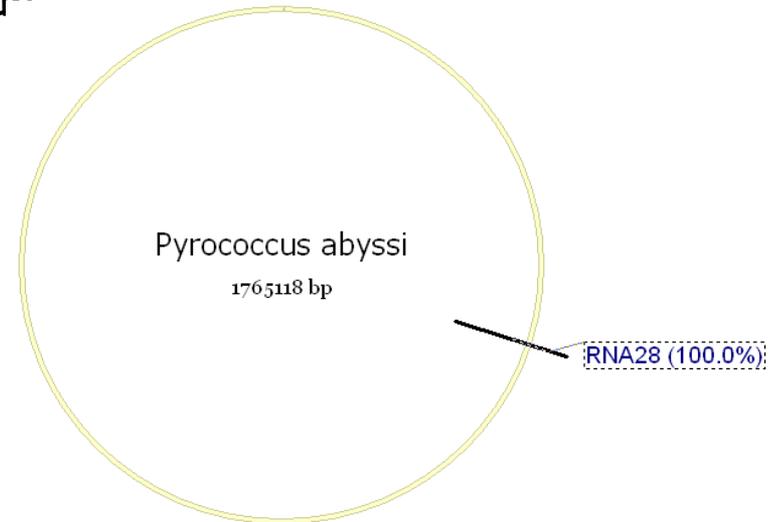
Hybridation avec une sonde radioactive
complémentaire et spécifique à la
séquence recherchée

Démarche expérimentale

Pour la recherche des candidats :

Hybridation avec une sonde marquée avec un isotope radioactif

- complémentaire
- spécifique (Vector NTI)
- ne formant ni dimère ni hairpin
- T_m compris entre 60 et 70°C pour une hybridation à 50°C



Résultats

Approche *ab initio*

Analyse comparative RNAsim

8 loci candidats

2 candidats
en cours de
test

6 candidats
testés

2 loci validés

58 loci candidats

32 candidats
en cours de
test

26 candidats
testés

8 loci validés
Dont 3 retrouvés
dans des CRISPR

Résultats

Approche *ab initio*

Analyse comparative RNAsim

8 loci candidats

2 candidats
en cours de
test

6 candidats
testés

2 loci validés

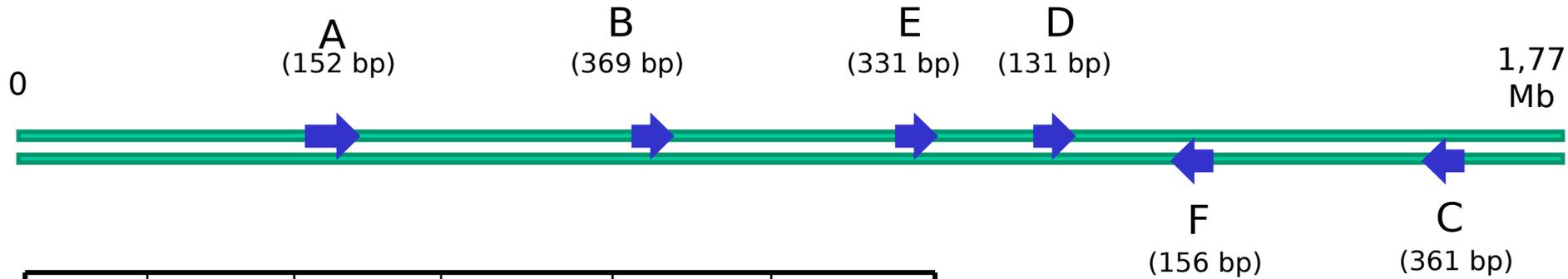
58 loci candidats

32 candidats
en cours de
test

26 candidats
testés

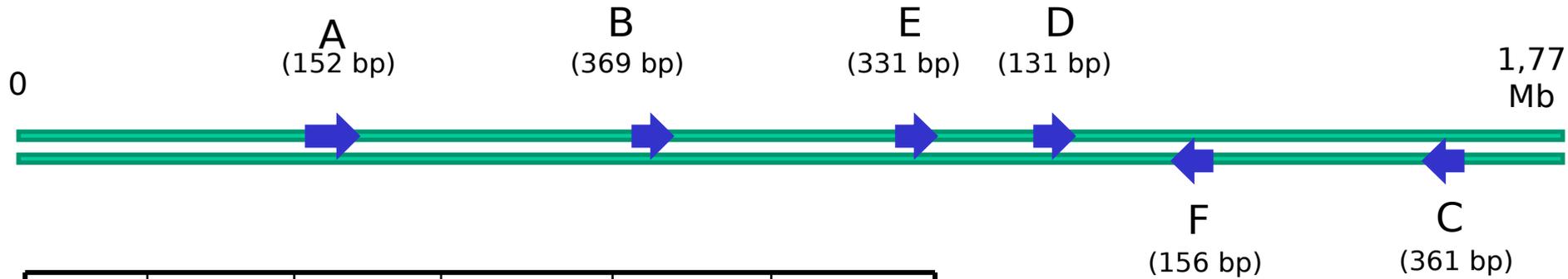
8 loci validés
Dont 3 retrouvés
dans des CRISPR

Approche *ab initio*



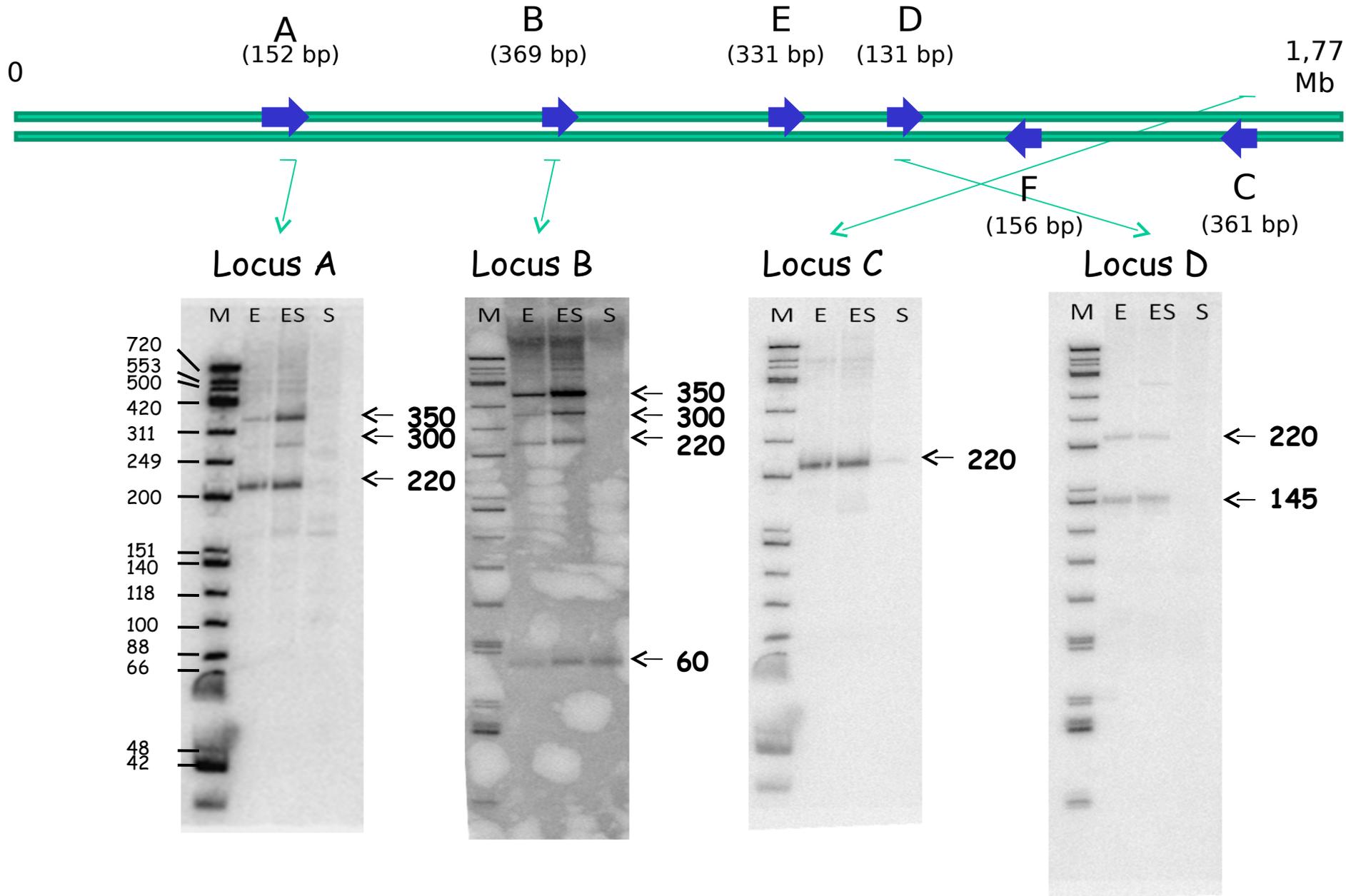
	Taille	HMM	K-TURN	Hairpin	Energie libre
A	152 nt			Oui	Oui
B	369 nt	Oui	Oui	Oui	Oui
E	331 nt		Oui		Oui
D	131 nt	Oui		Oui	Oui
F	156 nt			Oui	Oui
C	361 nt		Oui (2)	Oui	Oui

Approche *ab initio*

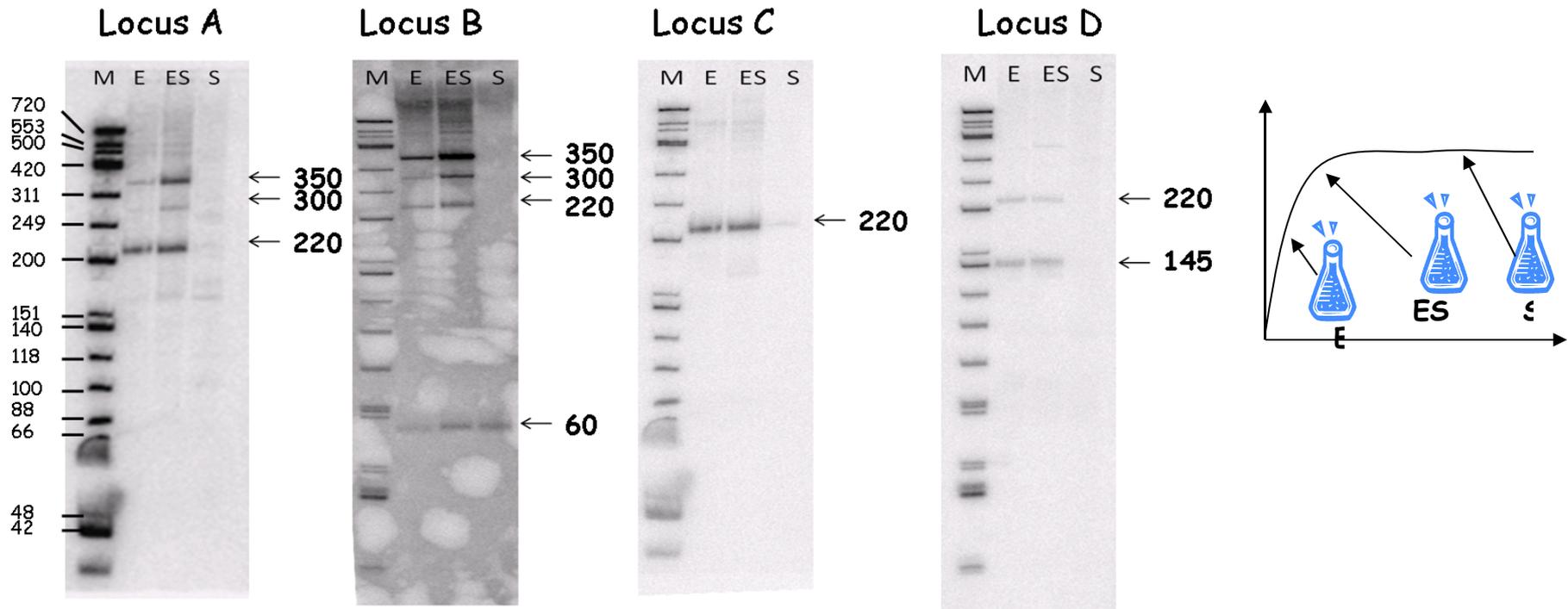


	Taille	HMM	K-TURN	Hairpin	Energie libre
A	152 nt			Oui	Oui
B	369 nt	Oui	Oui	Oui	Oui
E	331 nt		Oui		Oui
D	131 nt	Oui		Oui	Oui
F	156 nt			Oui	Oui
C	361 nt		Oui (2)	Oui	Oui

Approche *ab initio* : validation par Northern blot

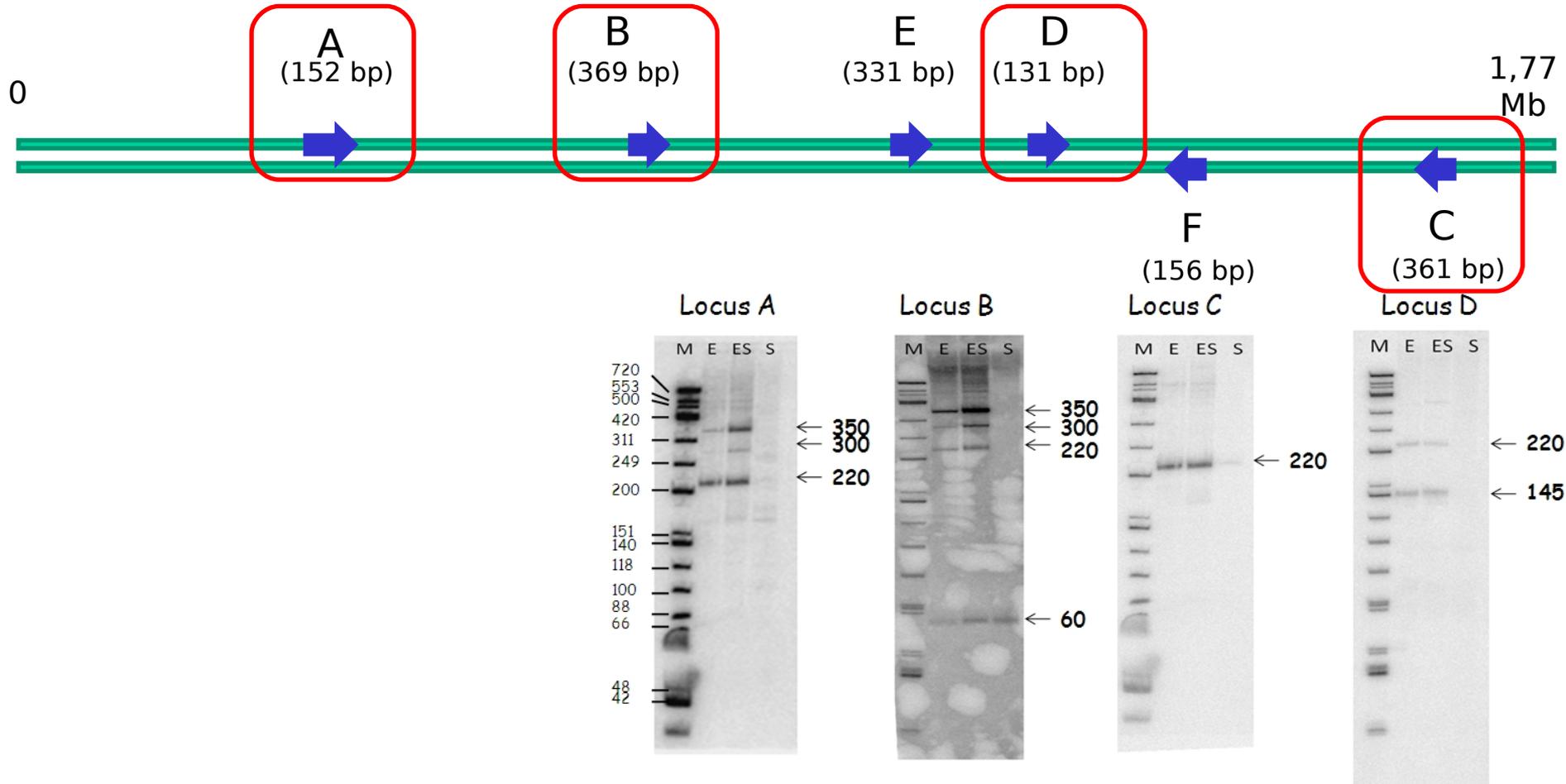


Approche *ab initio* : validation par Northern blot



- ⇒ 4 Loci semblent être transcrits
- ⇒ Transcrits de différentes tailles
- ⇒ Expression différentielle en fonction de la phase de croissance
 - ⇒ En entrée en phase stationnaire

Approche *ab initio*

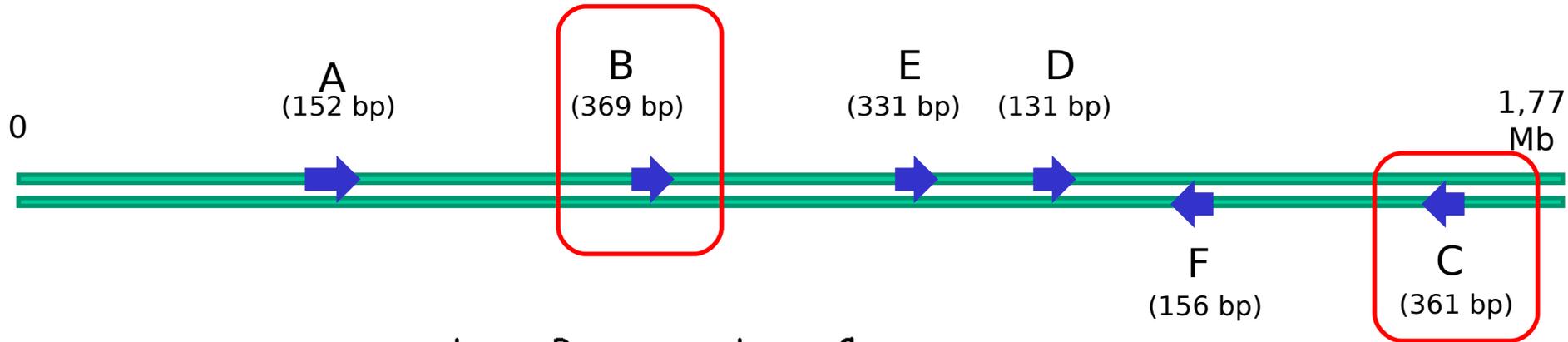


⇒ Similarité au niveau de la séquence nucléotidique

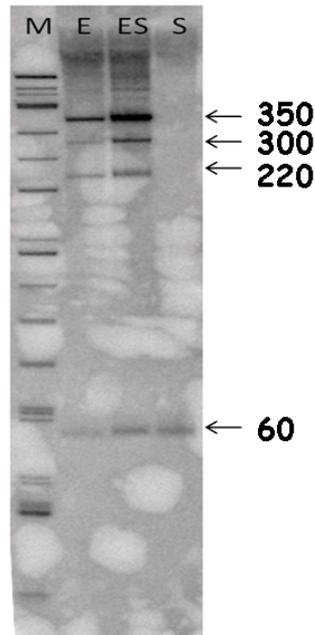
⇒ Cross-hybridation en Northern Blot ?

Approche *ab initio*

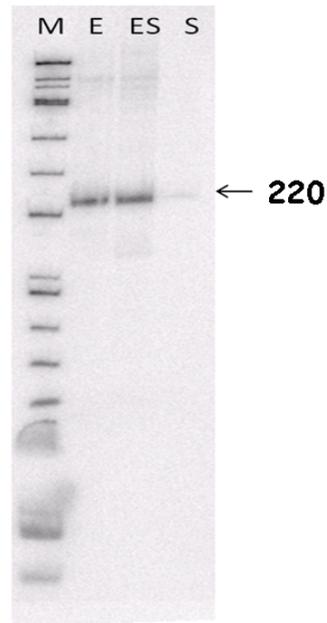
Séquençage par C-RACE



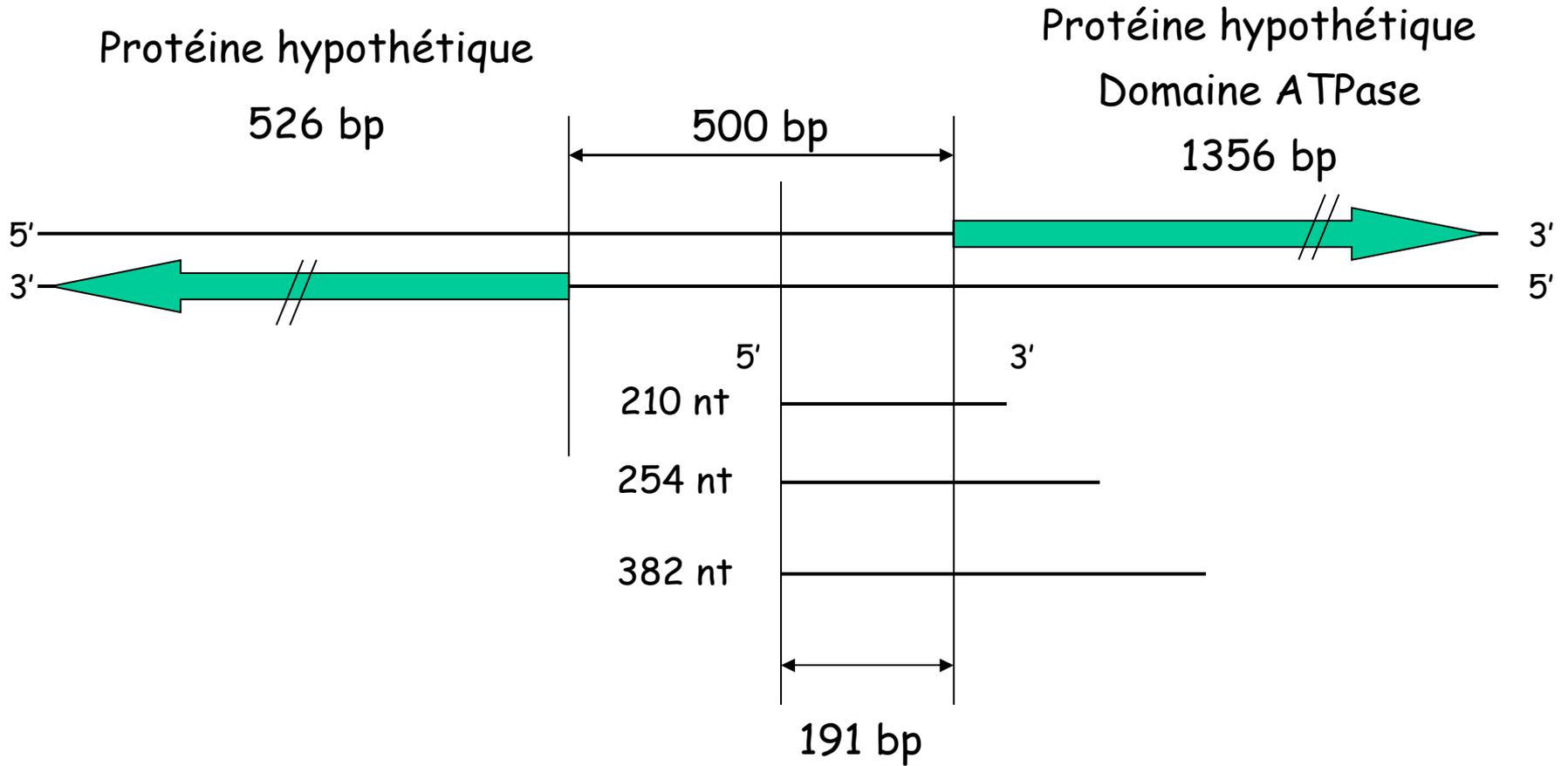
Locus B



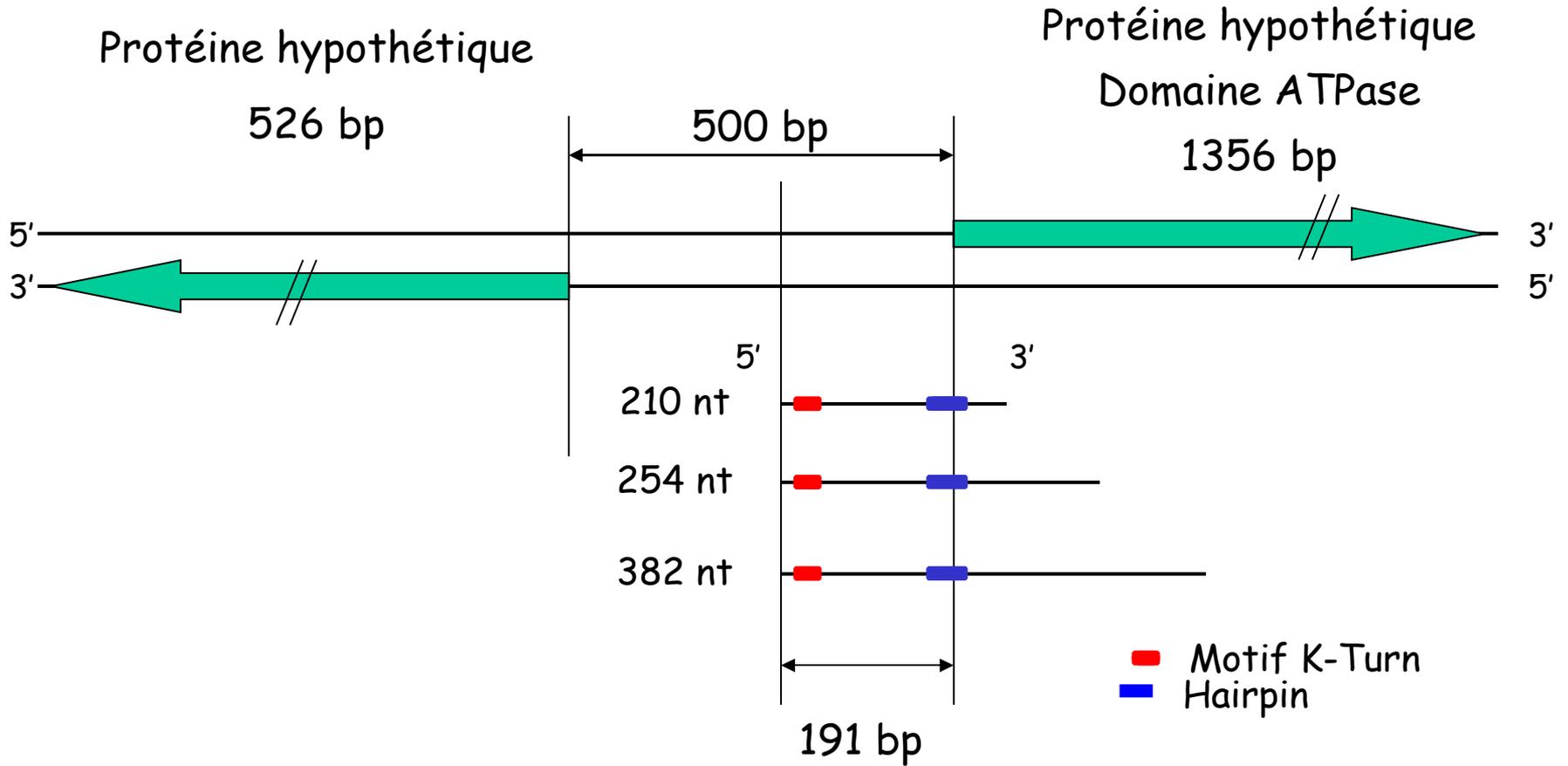
Locus C



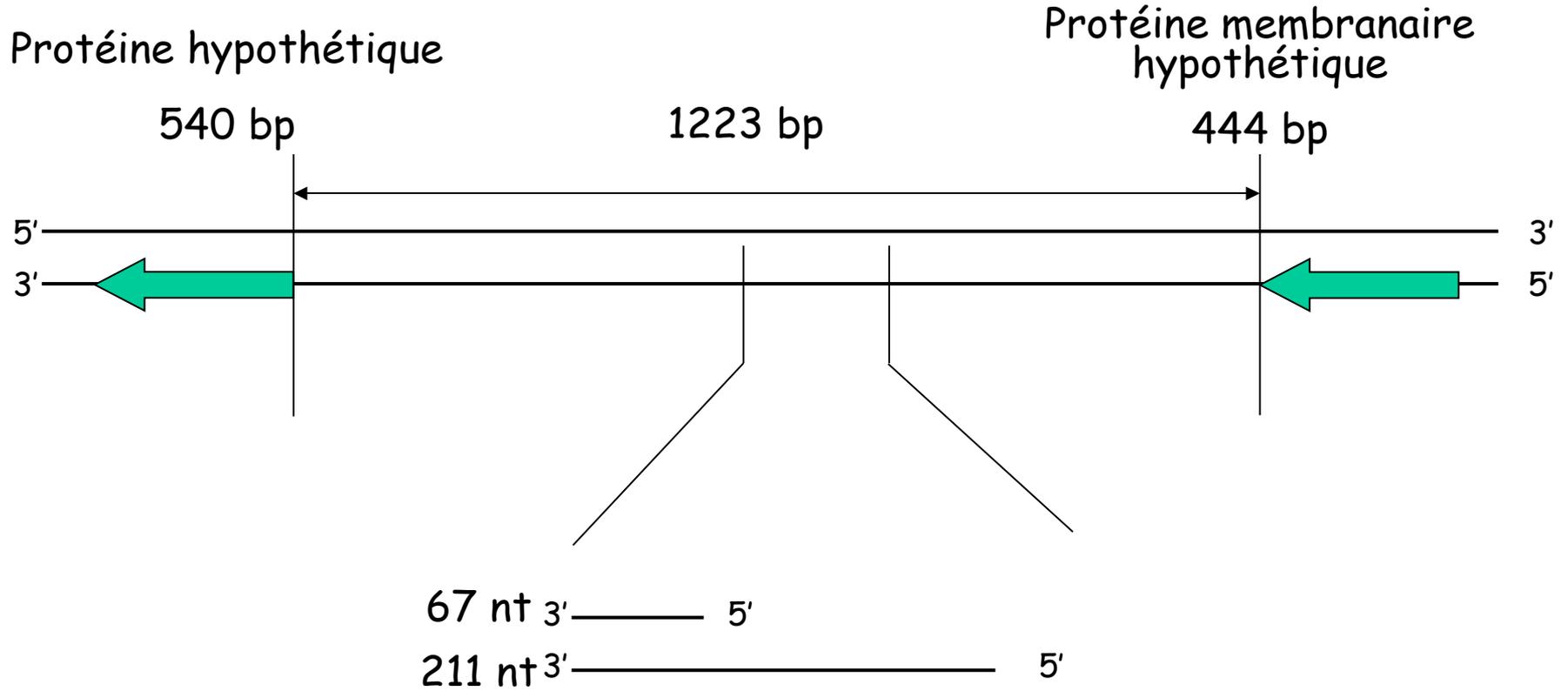
Approche *ab initio* : locusB



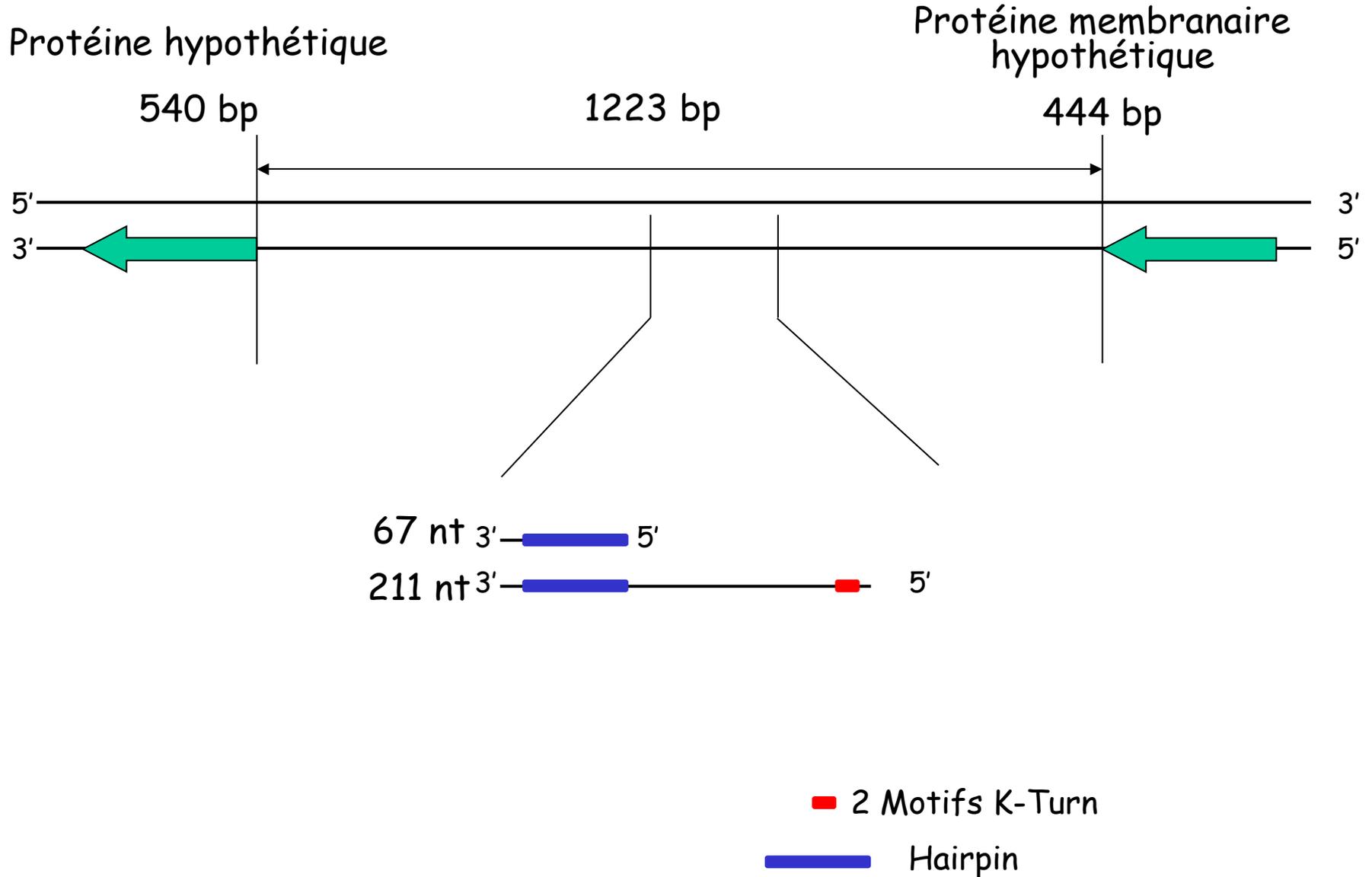
Approche *ab initio* : locusB



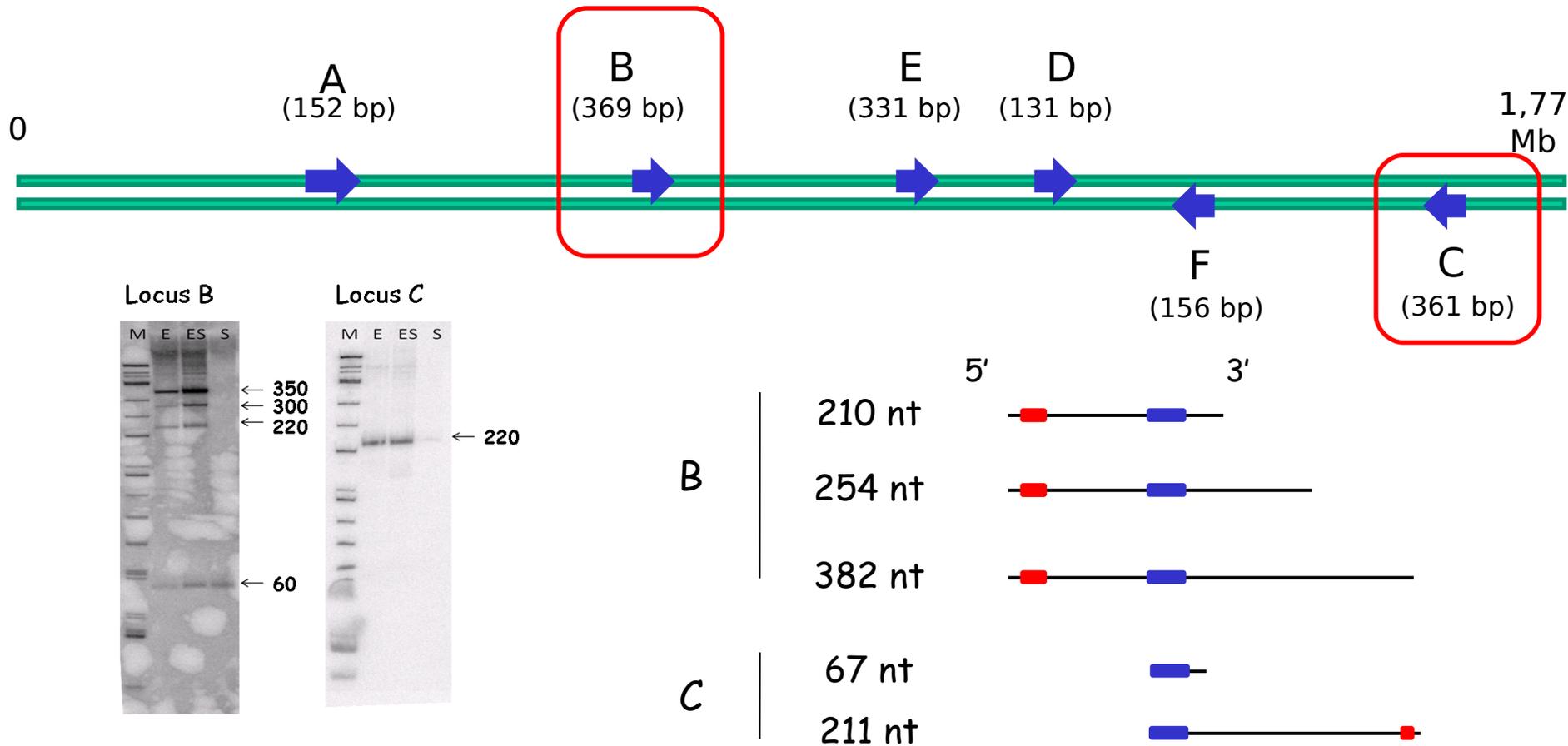
Approche *ab initio* : locusC



Approche *ab initio* : locusC



Approche *ab initio*



- ⇒ 2 loci transcrits de séquence nucléotidique similaire
- ⇒ expression différentielle suivant la phase de croissance
- ⇒ hairpin, motifs K-Turn = liaison à L7Ae ?
- ⇒ fonction ?

Conclusions

ARN connus

- 1 ARNase P
- 4 ARNr
- 1 ARN 7S
- 46 ARNt
- 59 sARN à boîte C/D
- 7 sARN à boîte H/ACA

Nouveaux ARN identifiés

Approche *ab initio*

- 2 loci transcrits

2 candidats
en cours de
test

Analyse comparative RNAsim

- Loci CRISPR
- autres (en cours)

32 candidats
en cours de
test

Perspectives

- Candidats *ab initio* : poursuite de la caractérisation des loci B et C
 - protéines associées, liaison à L7Ae ?
 - cibles ?
- Mise en place d'un crible plus global : séquençage à haut débit du transcriptome de *Pyrococcus abyssi*