

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

Kounthéa Phok

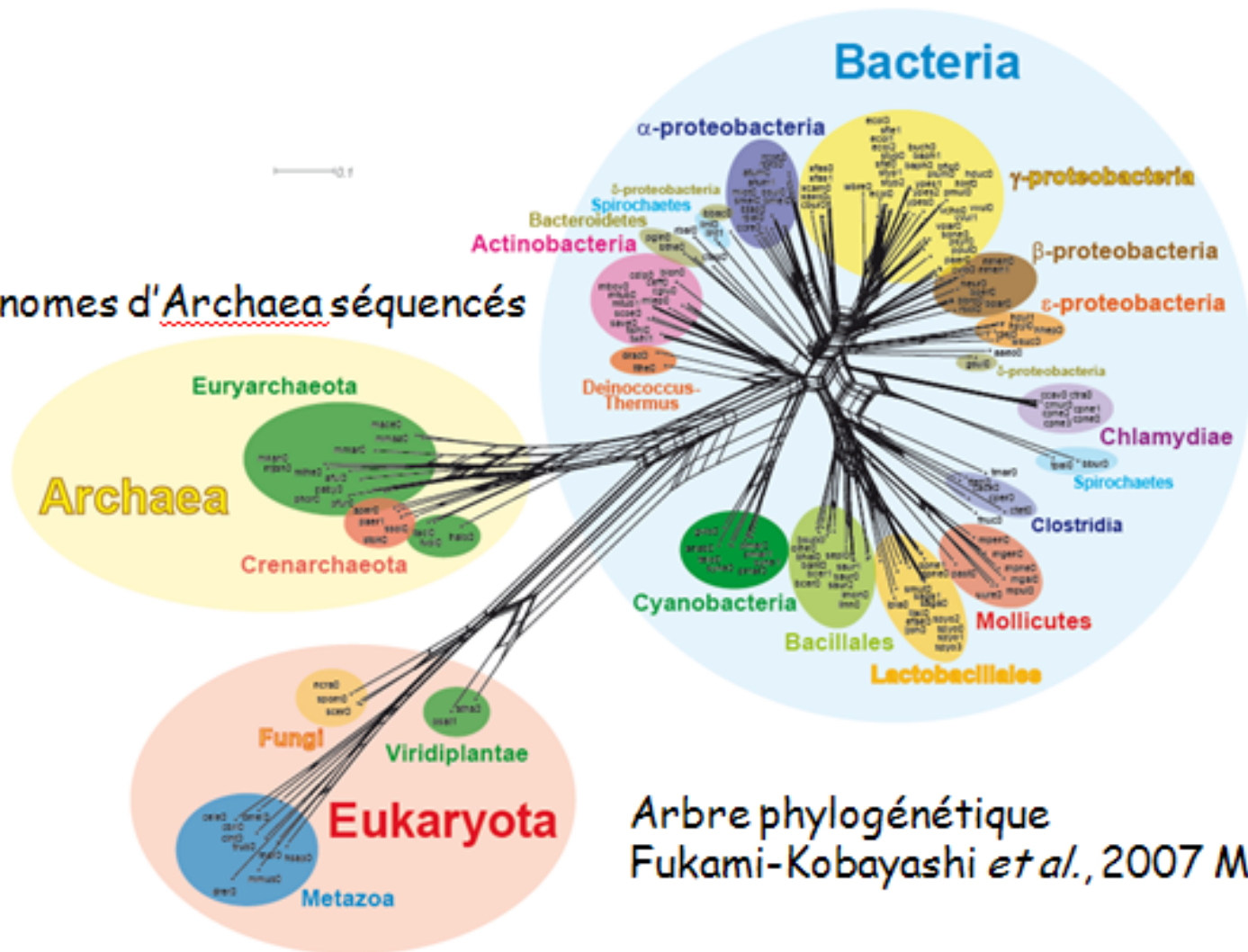
Béatrice Clouet d'Orval  
Equipe AJ Carpousis  
LMGM  
UMR5100 UPS-CNRS

Christine Gaspin et Annick Moisan  
LBIA  
UR INRA



# Les Archaea

56 génomes d'Archaea séquencés



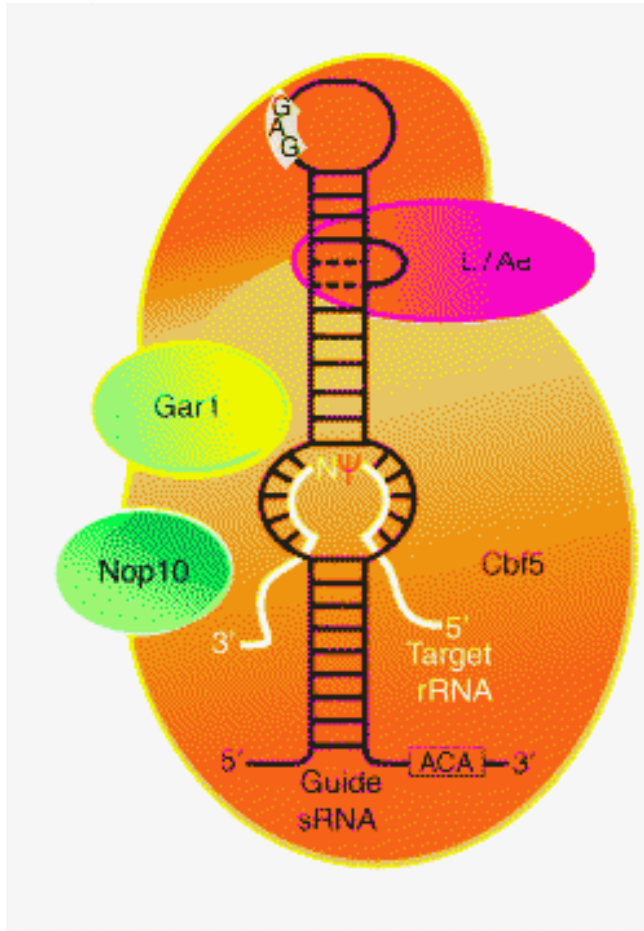
Arbre phylogénétique  
Fukami-Kobayashi *et al.*, 2007 MBE





# Les ARNnc connus chez Archaea

## Les sARN guides à boîte H/ACA

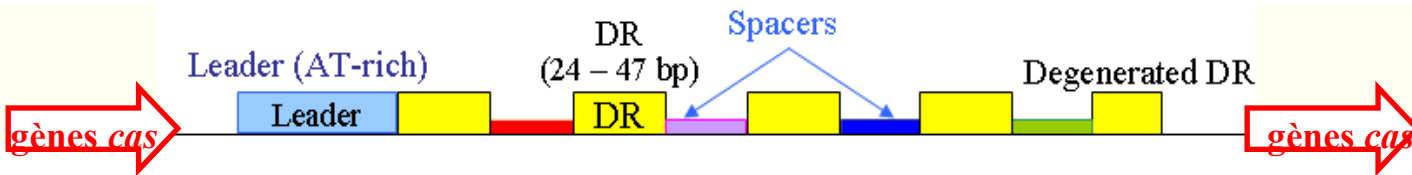


- Homologues aux snoARN H/ACA eucaryotes
- Protéines associées =  $\alpha$ CBF5,  $\alpha$ NOP10, L7Ae,  $\alpha$ GAR1  $\Rightarrow$  Pseudouridylation des ARNt et ARNr
- Poche de pseudouridylation





# Les ARNnc connus chez Archaea les CRISPR

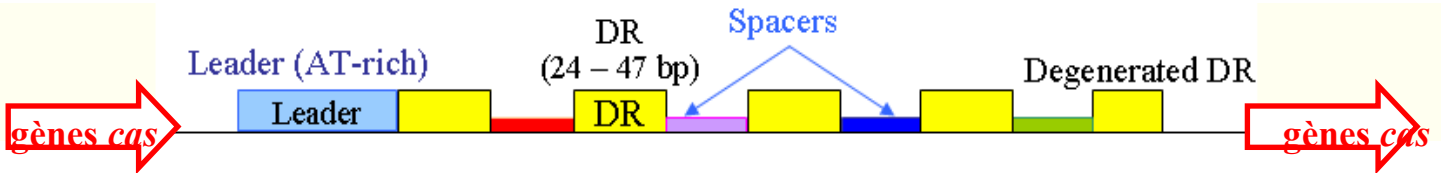


CRISPR = Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- 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

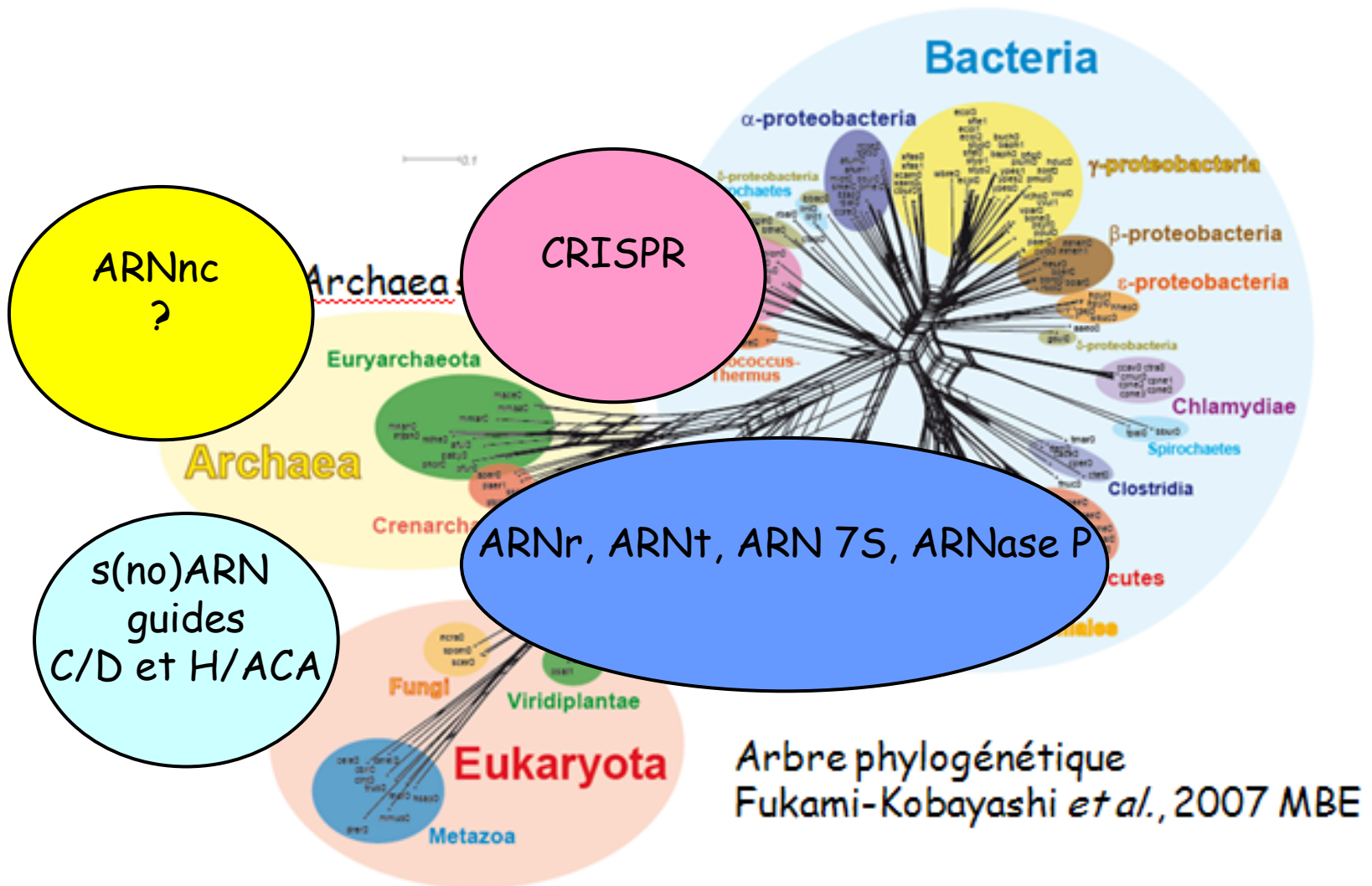
⇒ **ARN interférence chez les procaryotes**

- démontré chez *Streptococcus thermophilus*

Pour revue Sorek *et al.*, 2008

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

# Les ARN chez les Archaea



## Les ARNnc connus chez Archaea

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

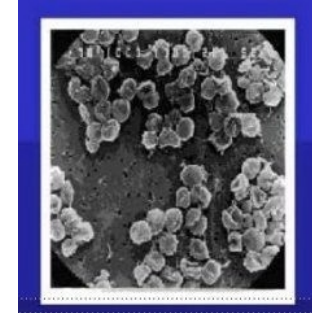
### ARNnc de fonction inconnue

- 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

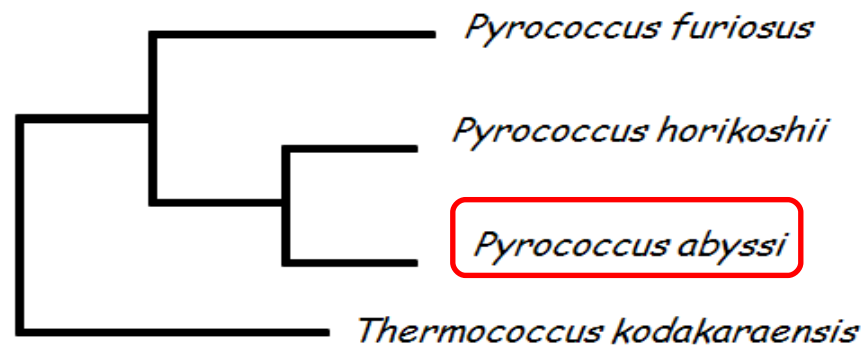
# *Pyrococcus abyssi* & Les Thermococcales

- 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)

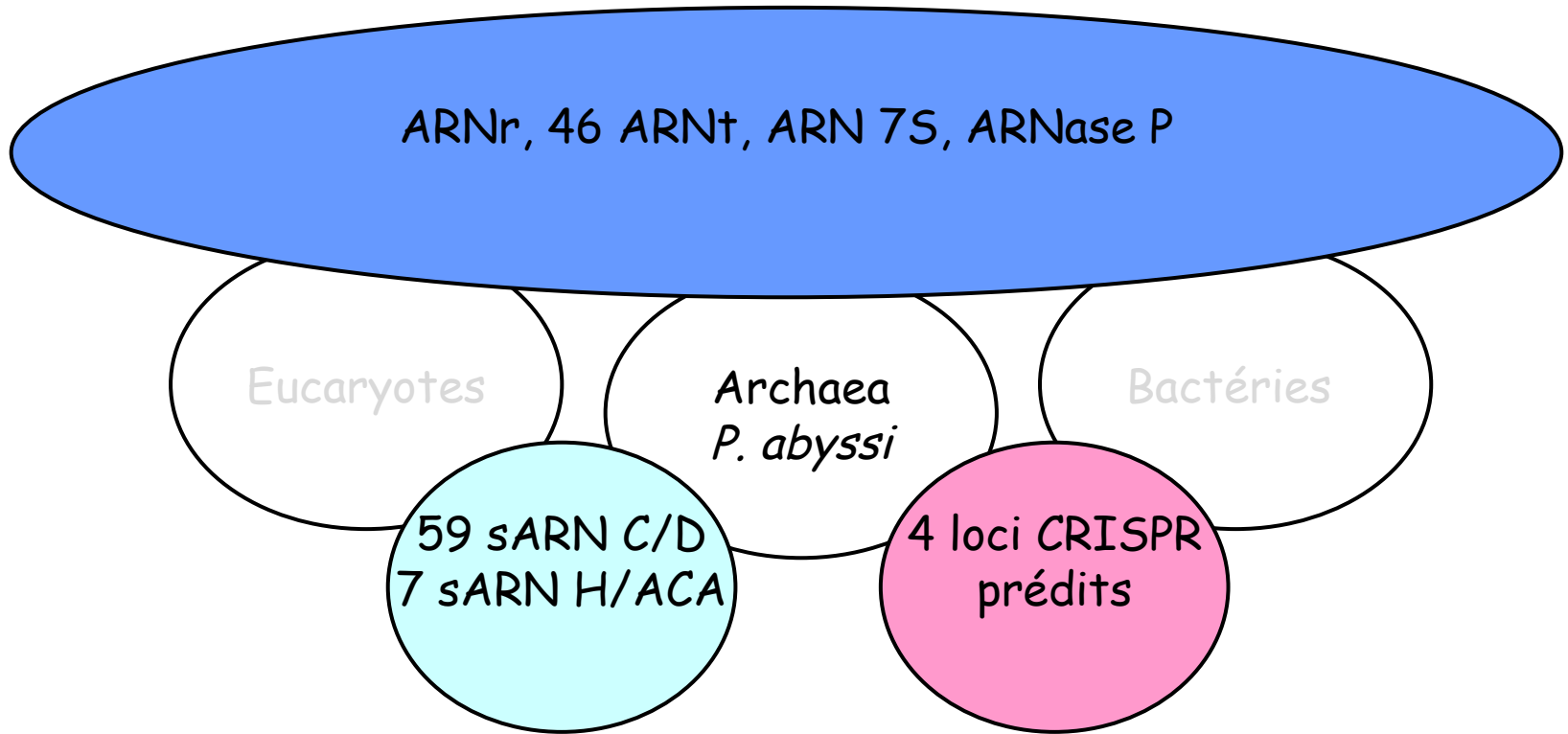
- Chromosome : 1,76Mb, 1993 gènes
- Plasmide pGT5 : 3,5 kb 2 gènes
- Riche en A/T



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*

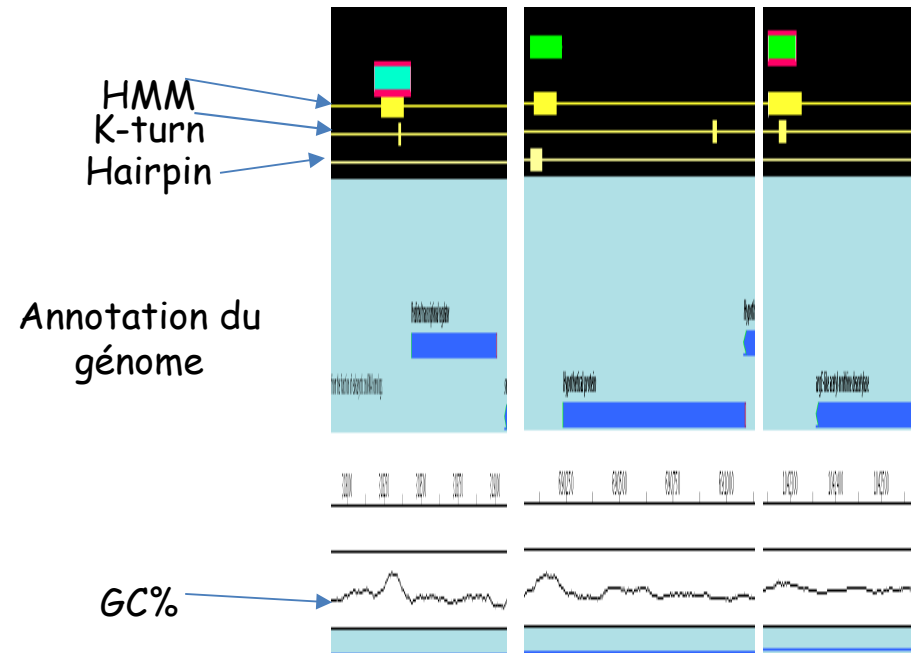
## Approche *ab initio*

- 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

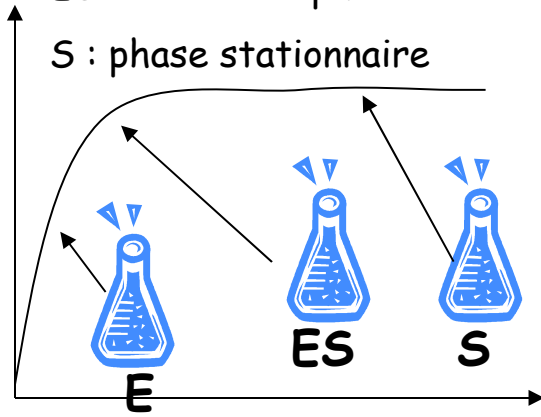
⇒ Validation expérimentale par Northern Blot

# Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

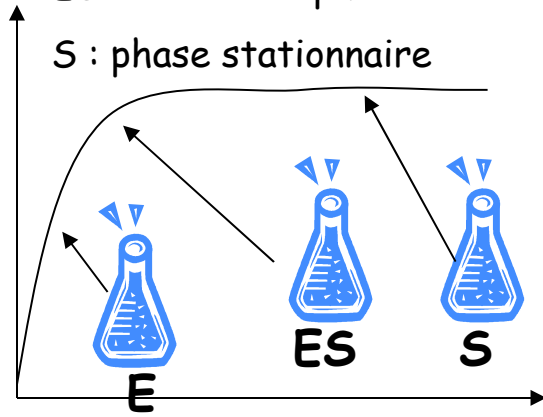


# Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

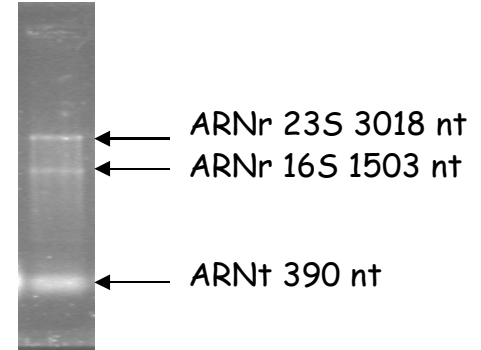


Extraction des ARN totaux



Vérification de la qualité des ARN

Gel agarose 2%

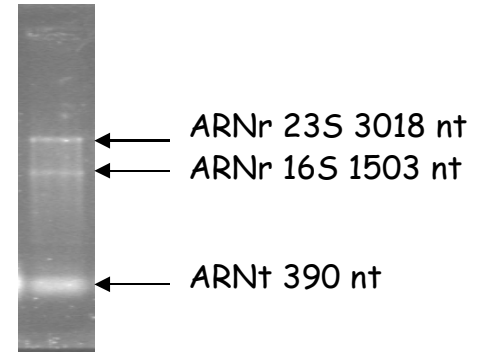
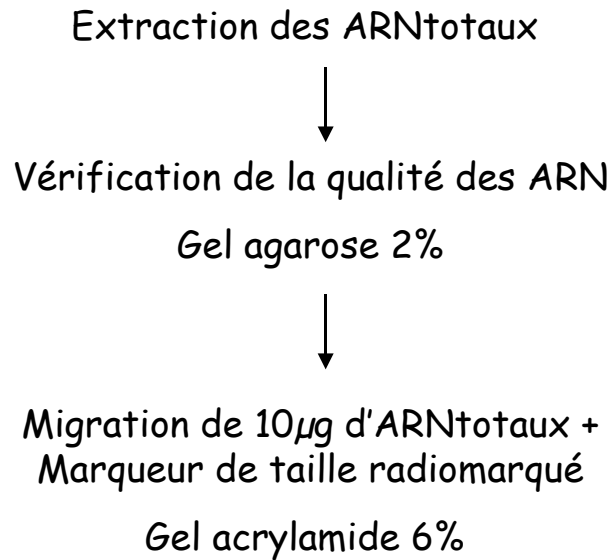
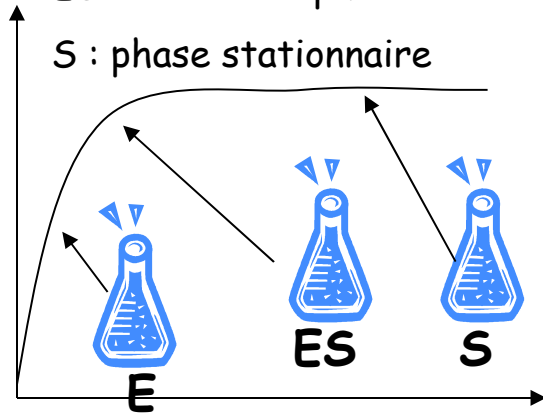


# Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

S : phase stationnaire

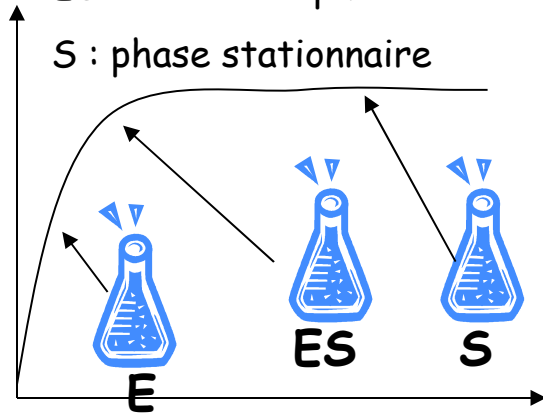


# Démarche expérimentale

E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

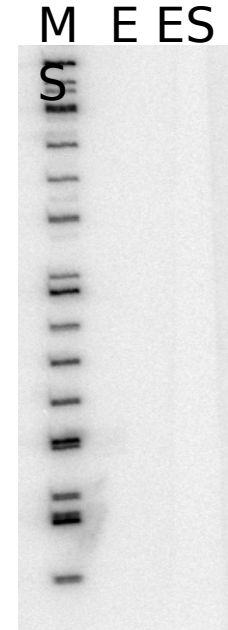
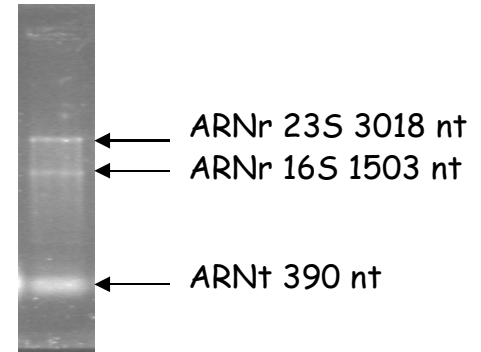
S : phase stationnaire



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

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

Transfert sur une membrane de  
nylon réutilisable

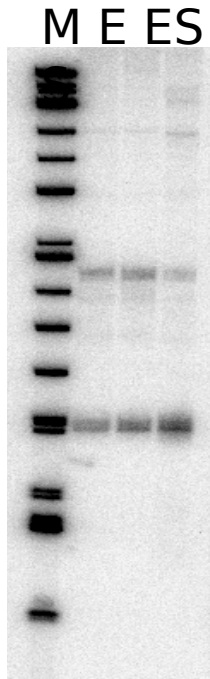
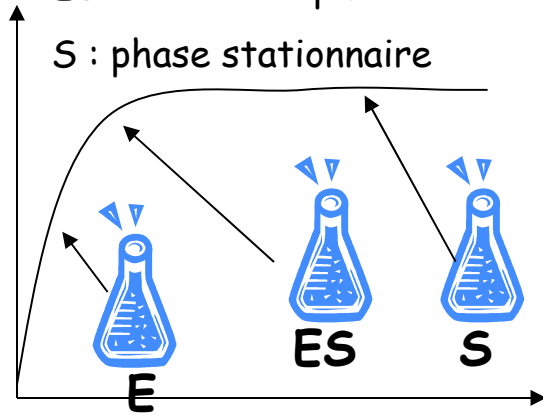


# Démarche expérimentale

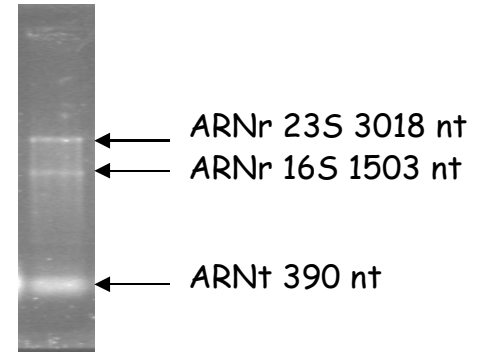
E : phase exponentielle

ES : entrée en phase stationnaire

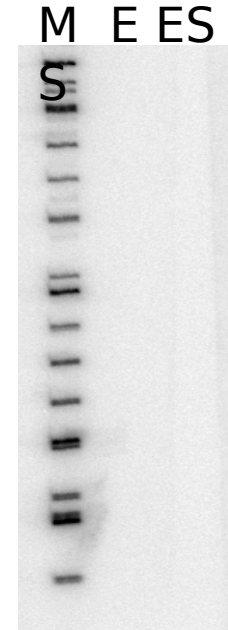
S : phase stationnaire



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



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



Transfert sur une membrane de  
nylon réutilisable

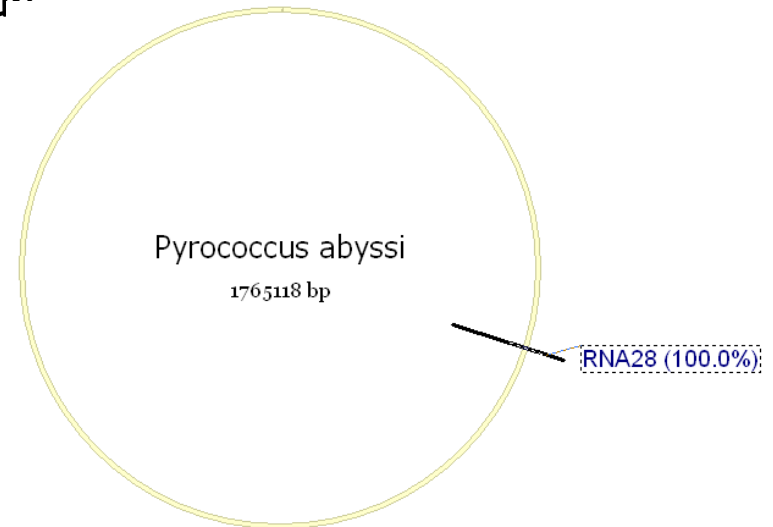
Hybridation avec une sonde radioactive  
complémentaire et spécifique à la  
séquence recherchée

# 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

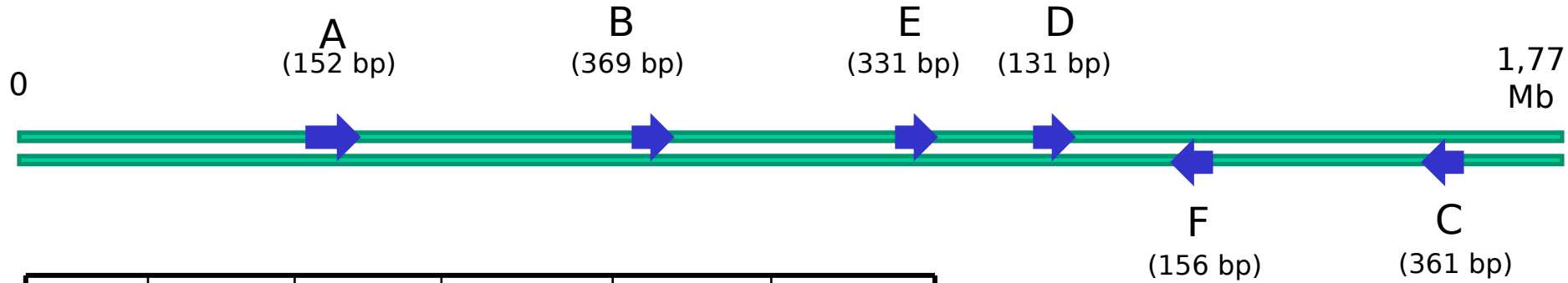
58 loci candidats

32 candidats  
en cours de  
test

26 candidats  
testés

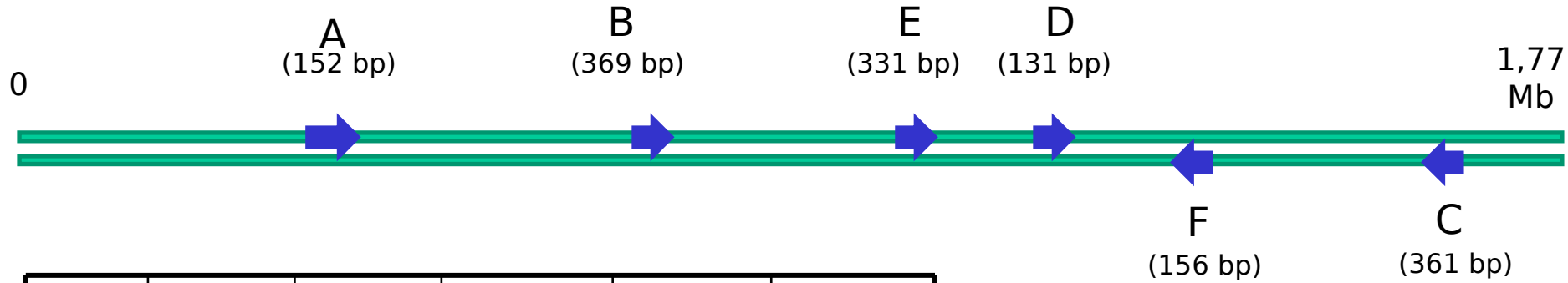
8 loci validés  
Dont 3 retrouvés  
dans des CRISPR

# Approche *ab initio*



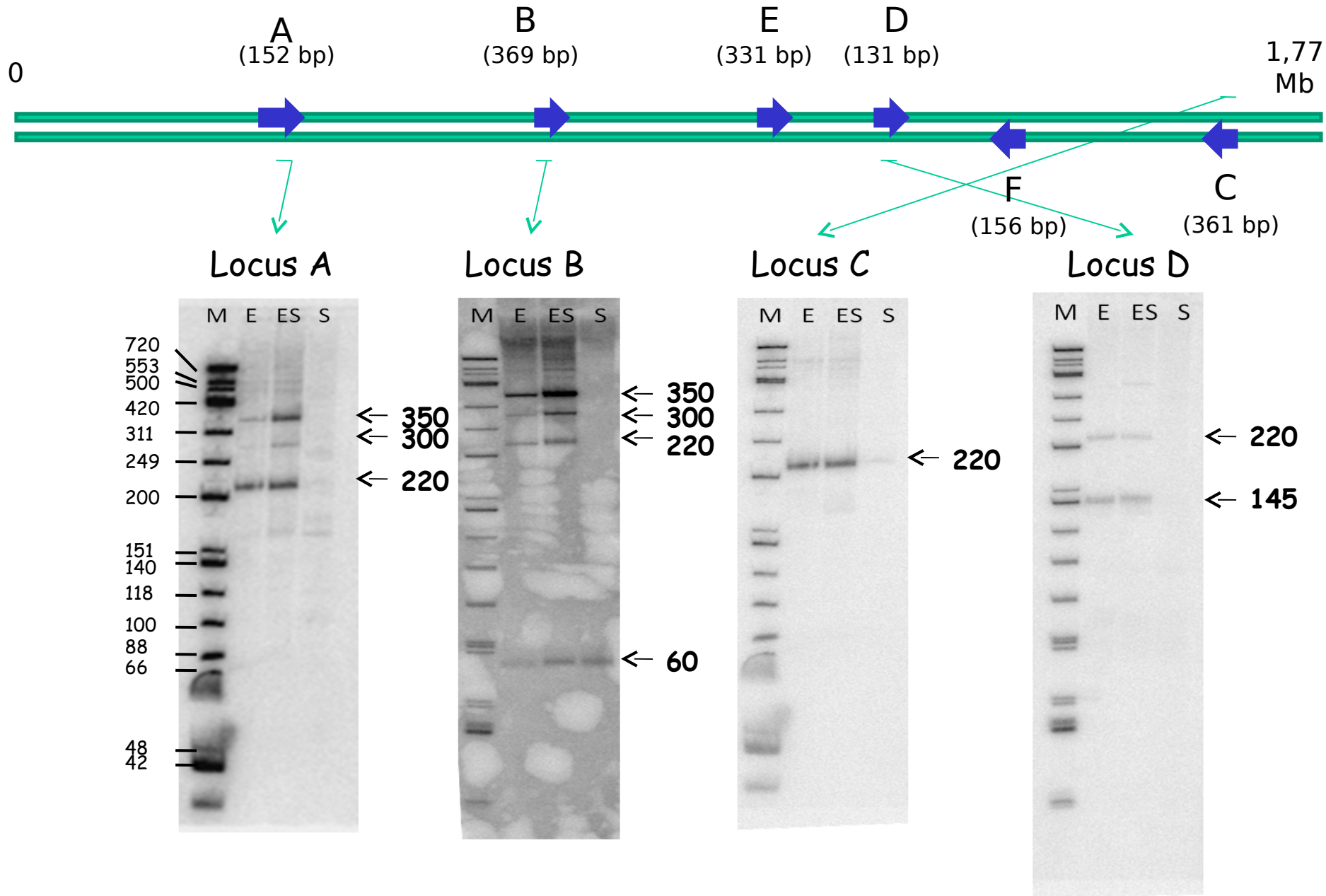
|   | Taille | HMM | K-TURN  | Hairpin | Energie libre |
|---|--------|-----|---------|---------|---------------|
| A | 152 nt |     |         | Oui     | Oui           |
| B | 369 nt | Oui | Oui     | Oui     | Oui           |
| E | 331 nt |     | Oui     |         | Oui           |
| D | 131 nt | Oui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

# Approche *ab initio*

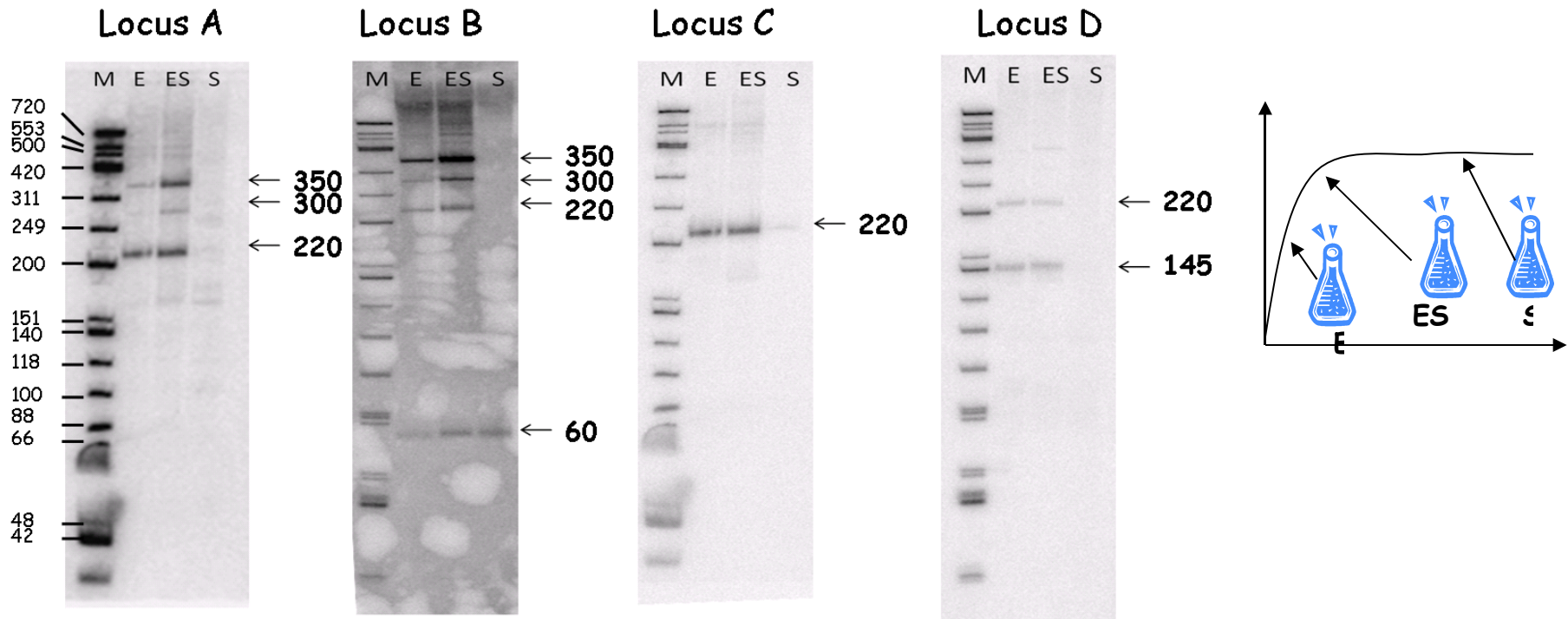


|   | Taille | HMM | K-TURN  | Hairpin | Energie libre |
|---|--------|-----|---------|---------|---------------|
| A | 152 nt |     |         | Oui     | Oui           |
| B | 369 nt | Oui | Oui     | Oui     | Oui           |
| E | 331 nt |     | Oui     |         | Oui           |
| D | 131 nt | Oui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

# Approche *ab initio* : validation par Northern blot

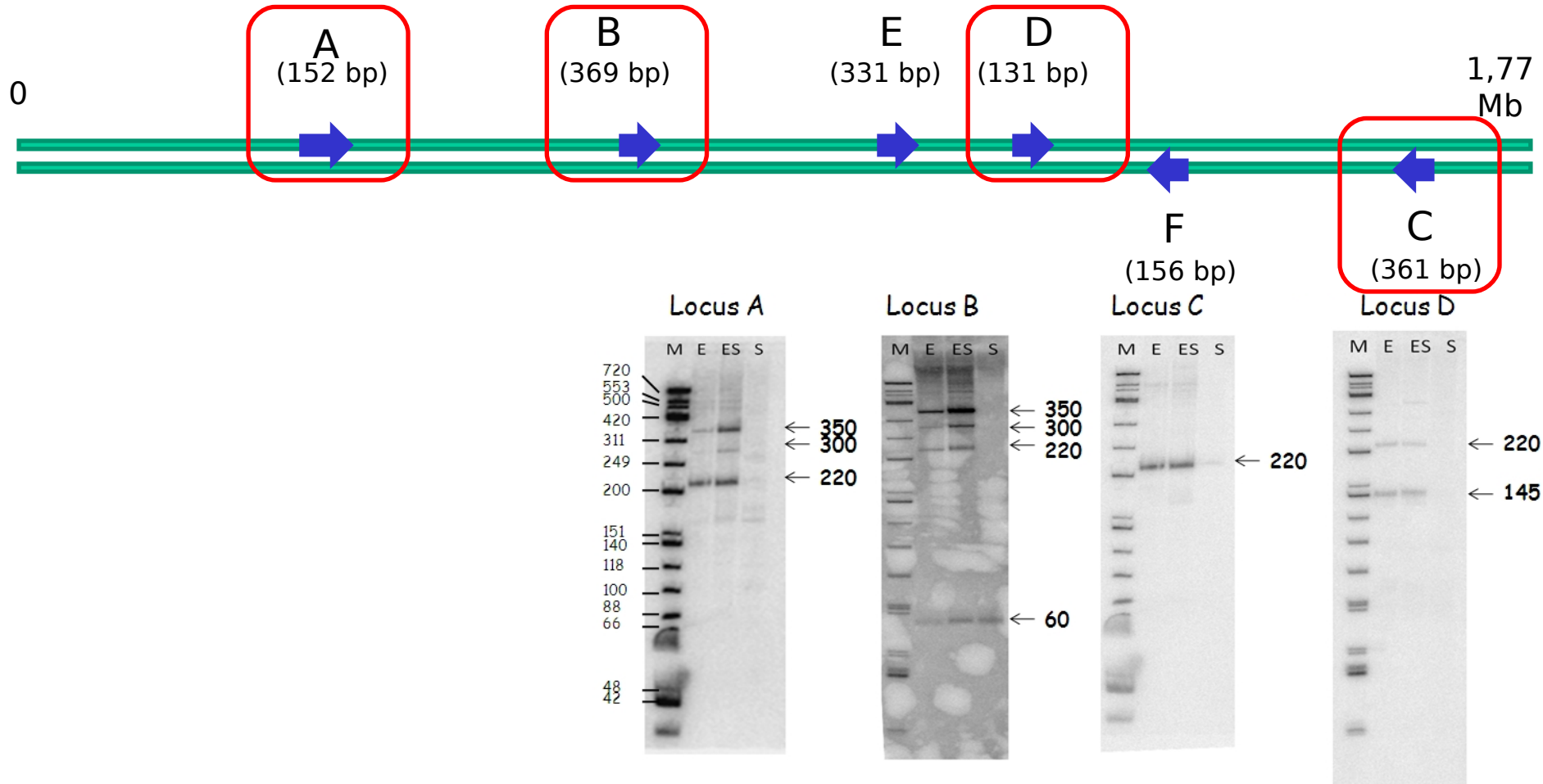


# Approche *ab initio* : validation par Northern blot



- ⇒ 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*

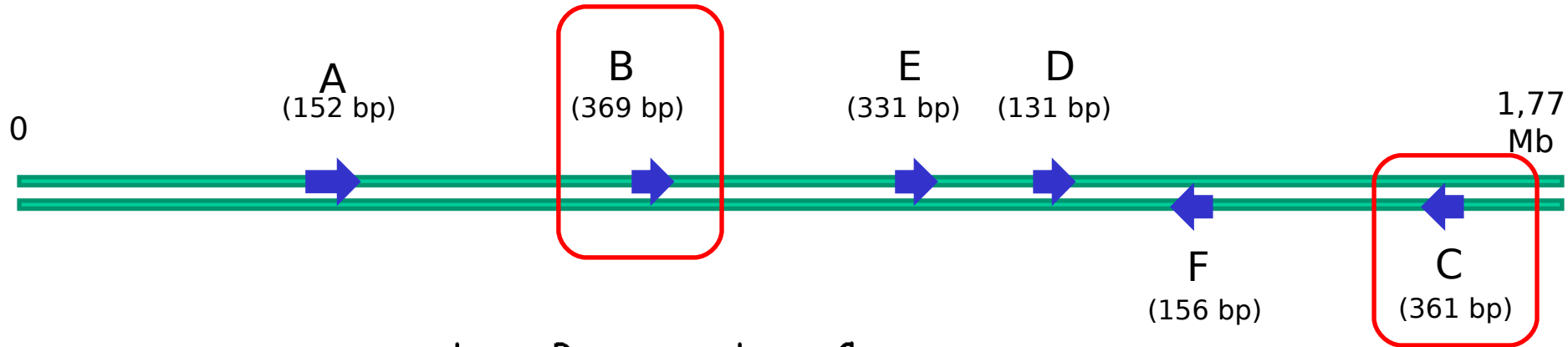


⇒ Similarité au niveau de la séquence nucléotidique

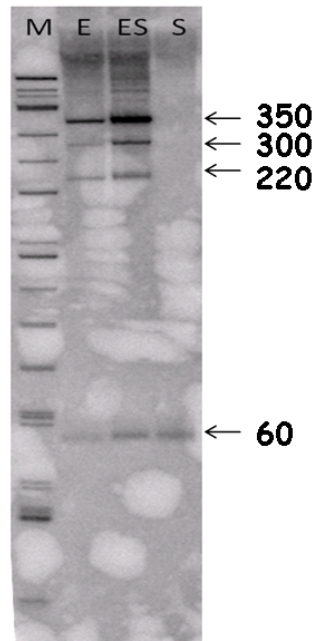
⇒ Cross-hybridation en Northern Blot ?

# Approche *ab initio*

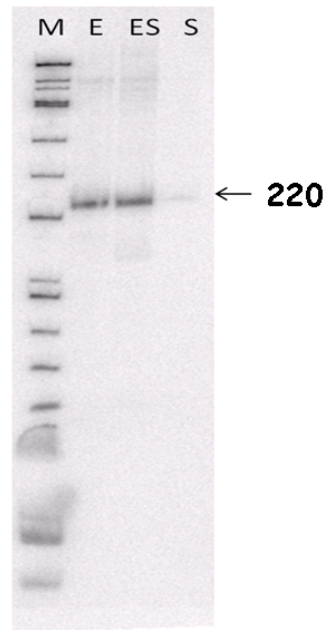
## Séquençage par C-RACE



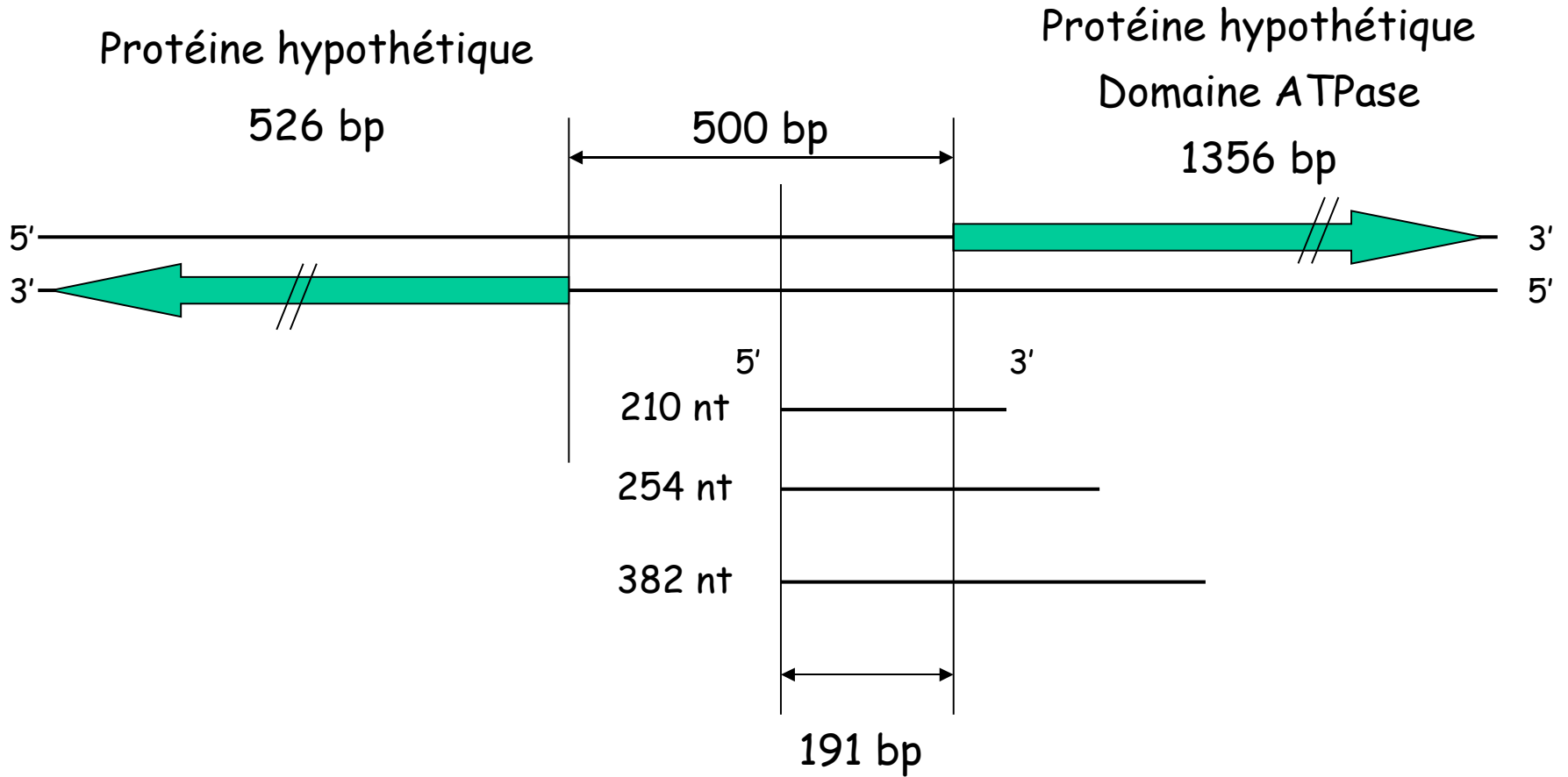
Locus B



Locus C

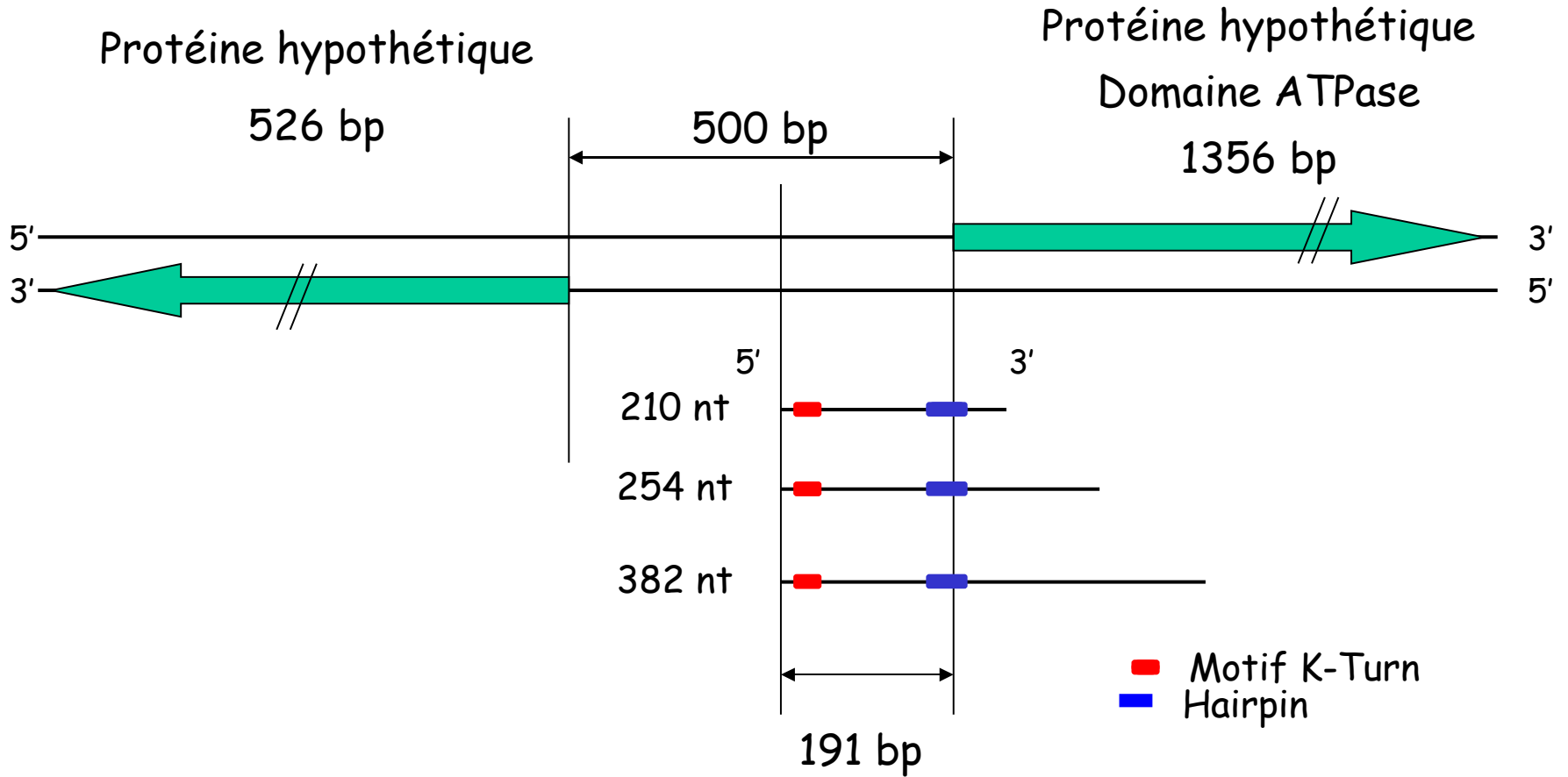


# Approche *ab initio* : locusB

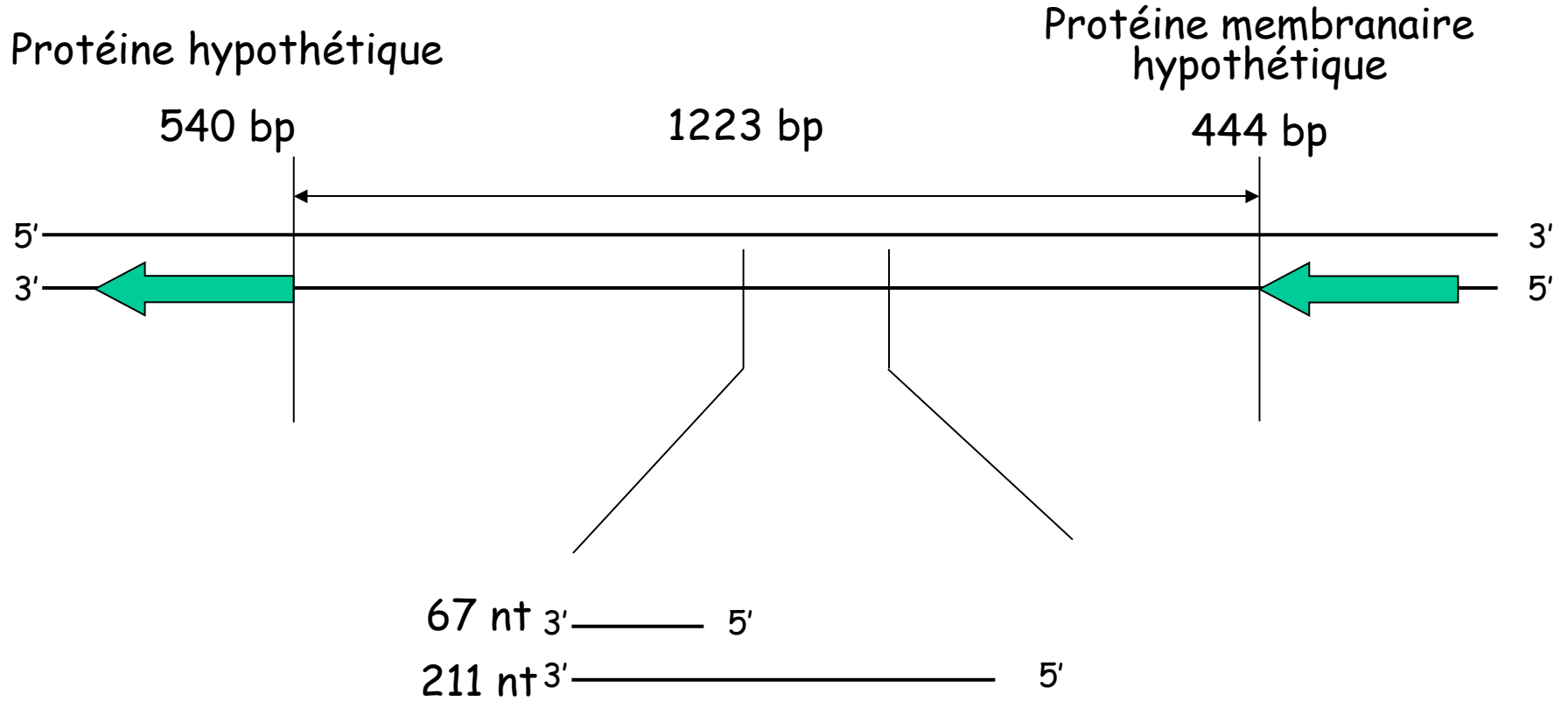




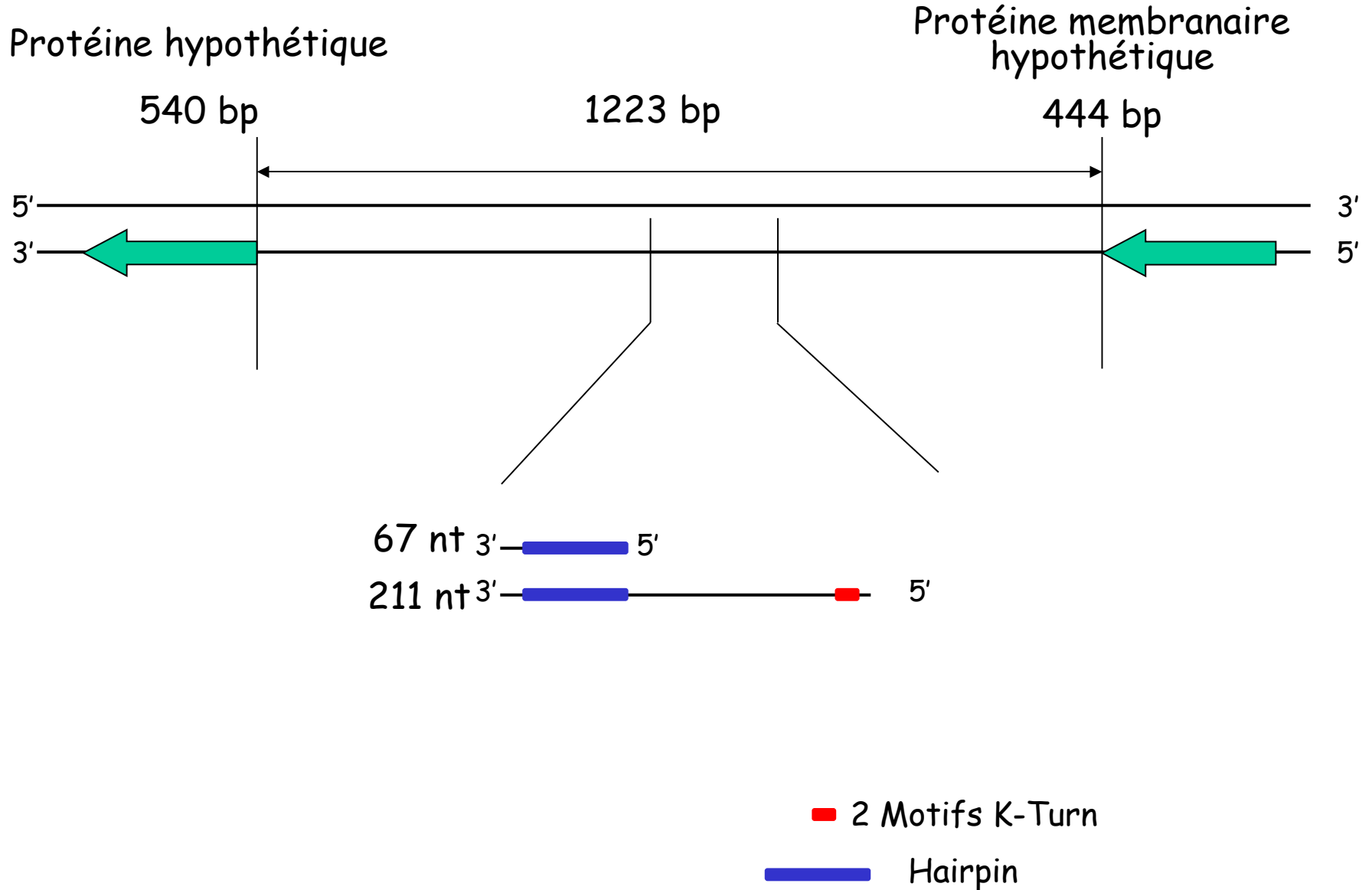
# Approche *ab initio* : locusB



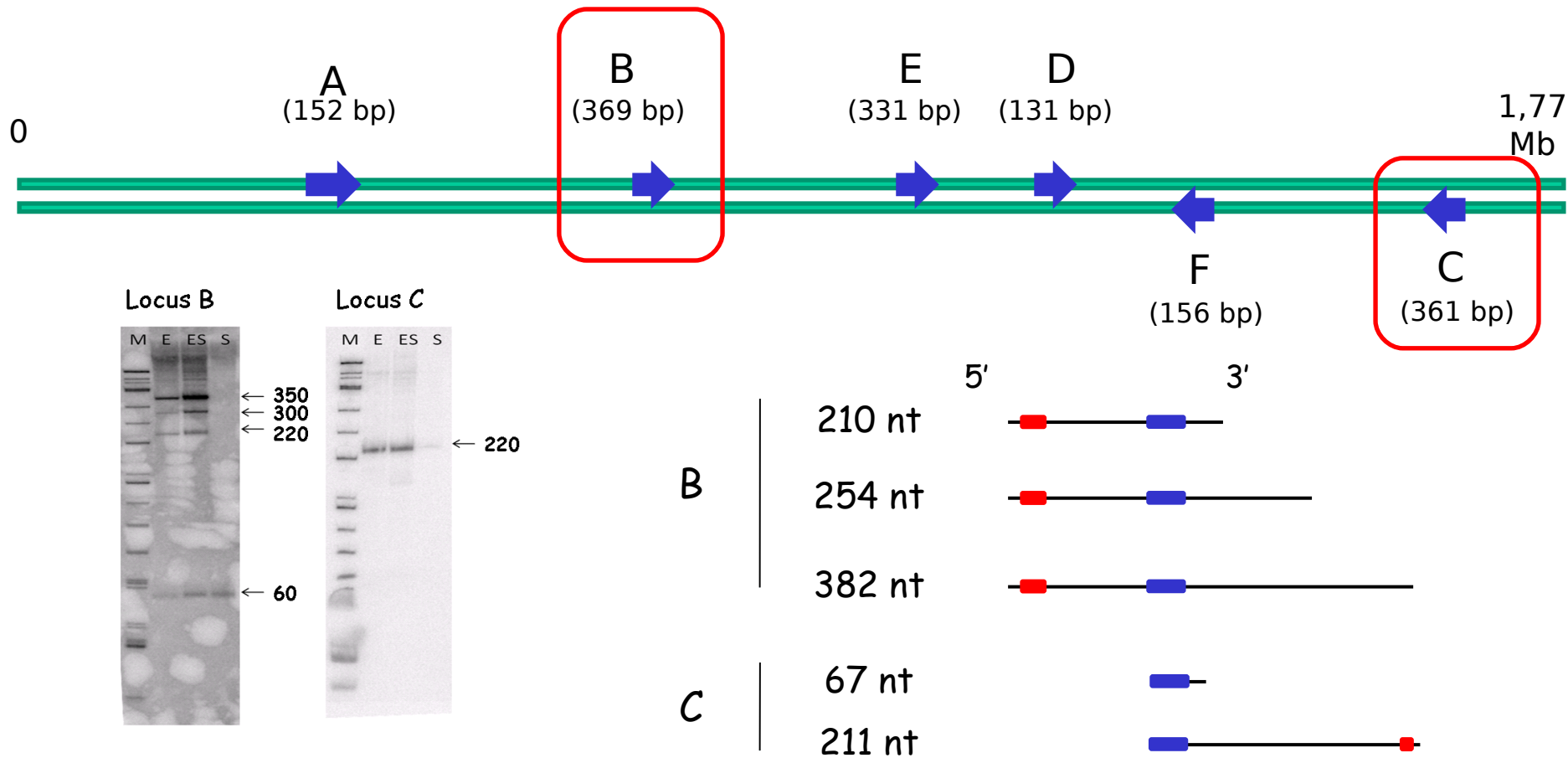
# Approche *ab initio* : locusC



# 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*