

Rôles des petits ARN dans la régulation de l'expression des gènes

Réunion annuelle NETBIO
18-19 septembre AgroParisTech

Richard Berthomé
Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes
richard.berthome@toulouse.inra.fr

ibiSc

1-Introduction

- Découverte chez les plantes et caractéristiques
- chez les autres eucaryotes?

2-Classification-gènèse et mode d'action

3-Cibles, fonctions

4-ARN interférence: outil de génomique fonctionnelle

ibiSc



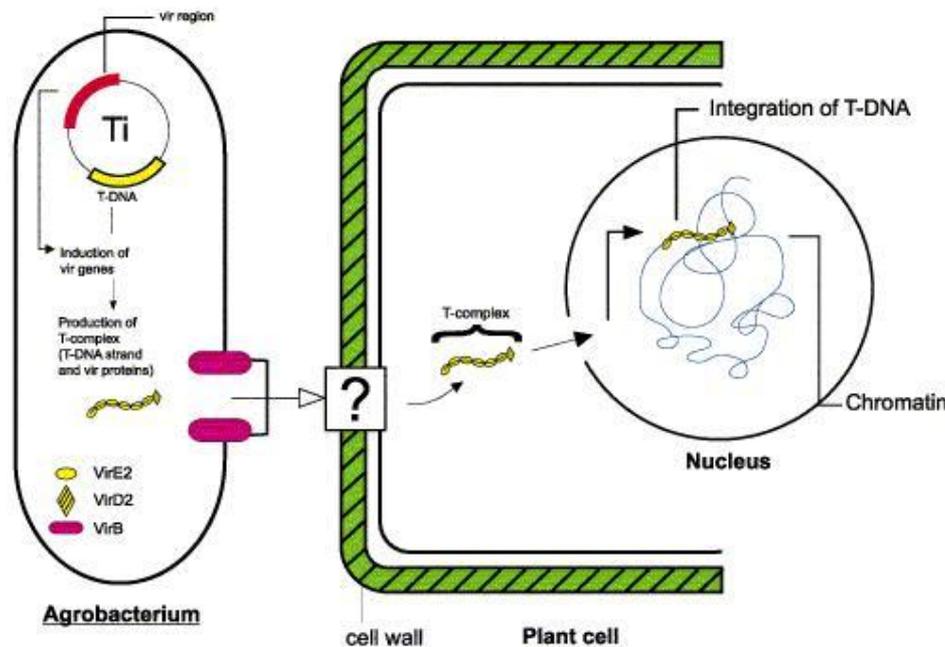
Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes



Apports de la transgénése dans la découverte du rôle des petits ARN chez les plantes

Insertion dans le génome d'ADN-T/agrotransformation

- Analyse fonctionnelle
- Outil de génomique pour créer des lignées d'insertion mutantes

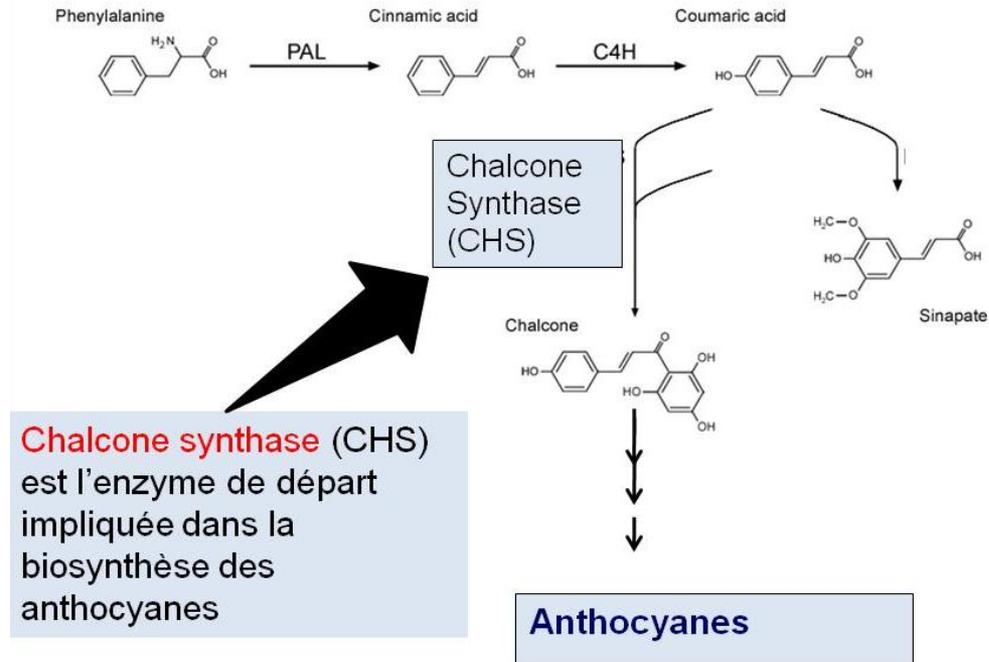


T-DNA transfer into the Plant's Genome

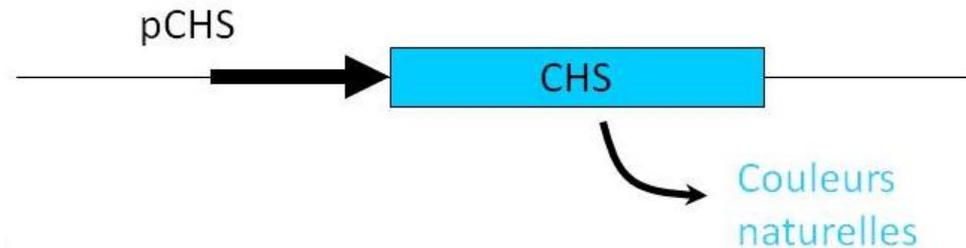
Adapted from Zupan et al 2000

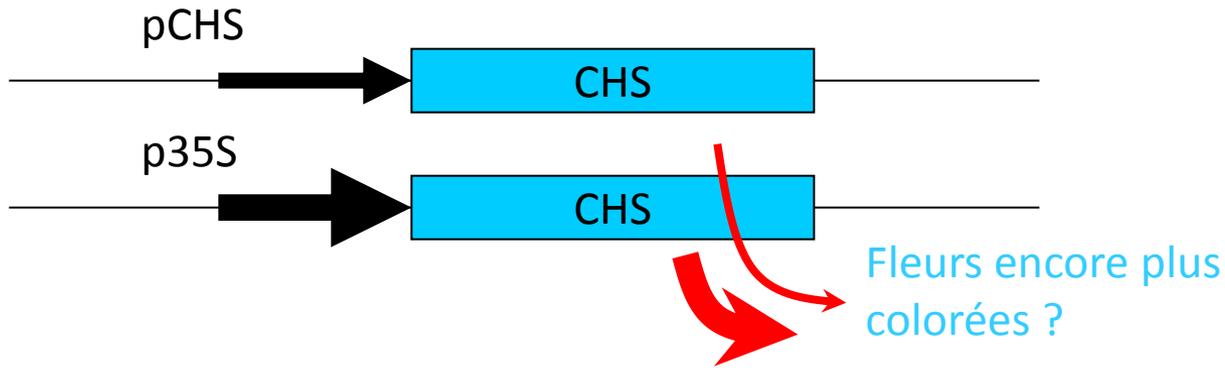
- ADN transféré du génome de l'agrobactérie au génome de la plante = « ADN de transfert »
- Intégration dans le génome

Manipulation de la chalcone synthase

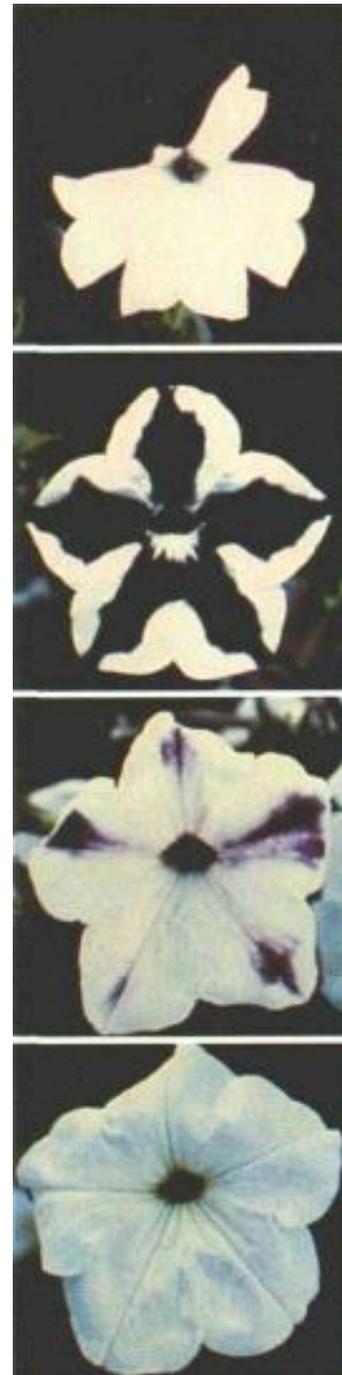


Endogène





NON



The Plant Cell, Vol. 2, 279–289, April 1990 © 1990 American Society of Plant Physiologists

Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*

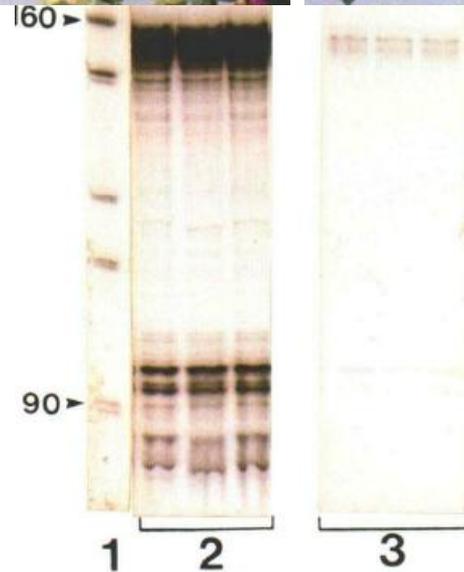
Carolyn Napoli,¹ Christine Lemieux, and Richard Jorgensen²

DNA Plant Technology Corporation, 6701 San Pablo Avenue, Oakland, California 94608

Fleurs violettes



Fleurs blanches



ARN associé au transgene



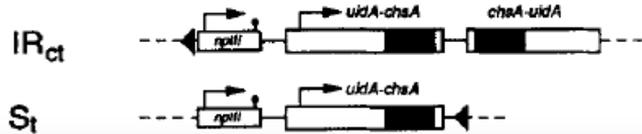
ARNm endogène

Pas d'expression du gène endogène ou du transgène

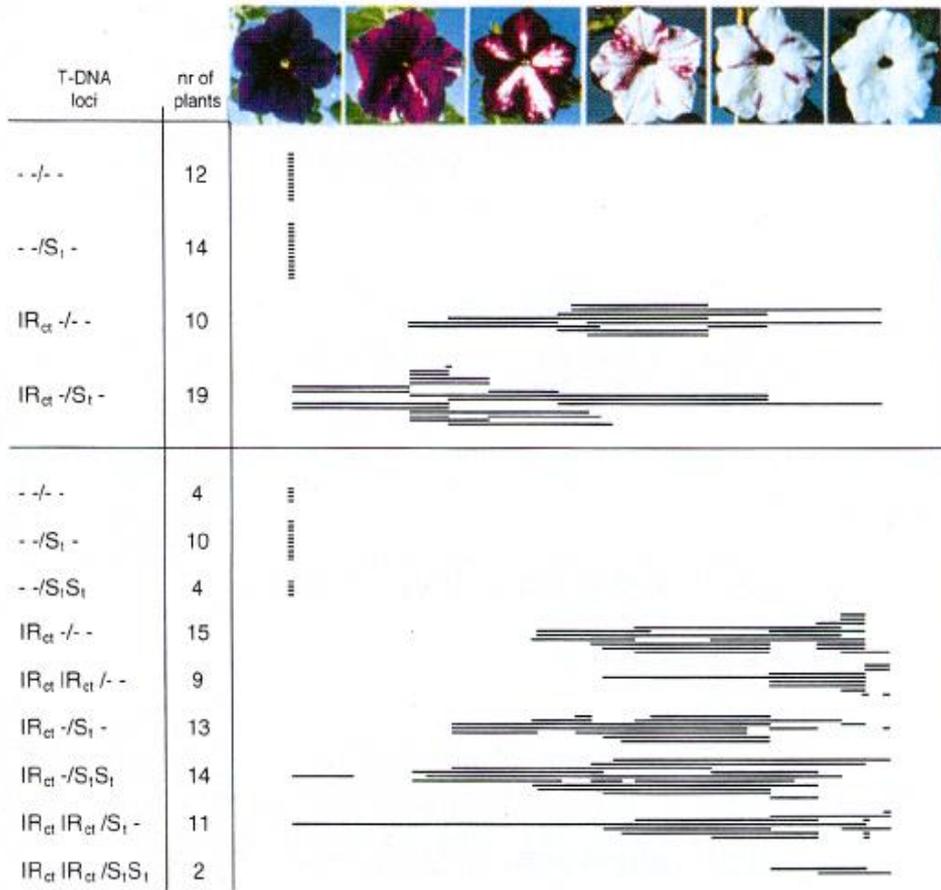
Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats

Maike Stam, Rob de Bruin, Susan Kenter,
Renier A.L. van der Hoorn, Rik van Blokland[†],
Joseph N.M. Mol and Jan M. Kooter*

PSE19-1



(C) PSE19-1



IR: Inverted repeats à l'origine de la production de siRNA

Efficacité du PTGS dépend:

-de la présence d'IR

-du nombre de copies du gène dans le génome

Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA

PETER M. WATERHOUSE*, MICHAEL W. GRAHAM, AND MING-BO WANG

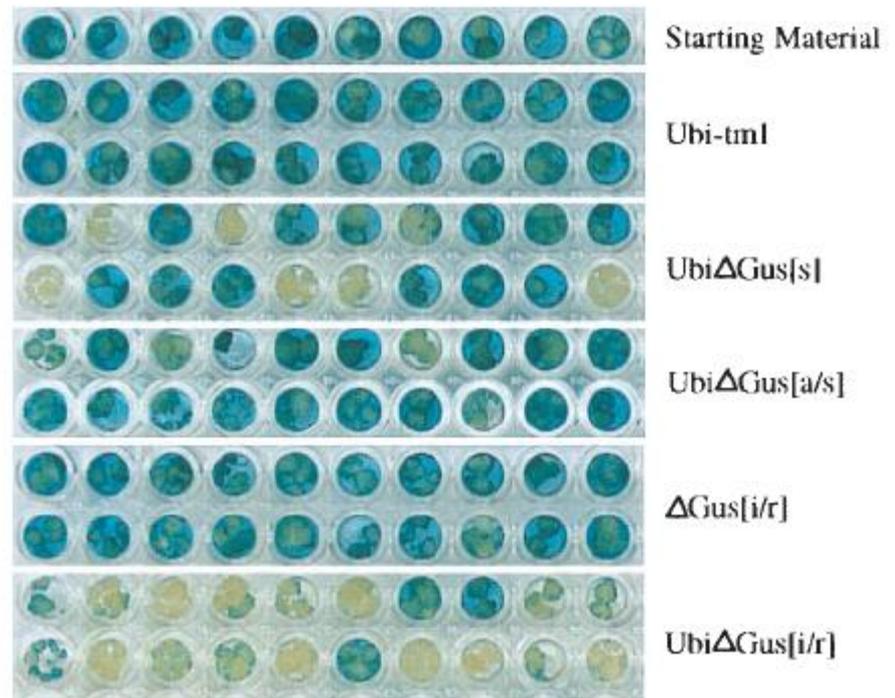
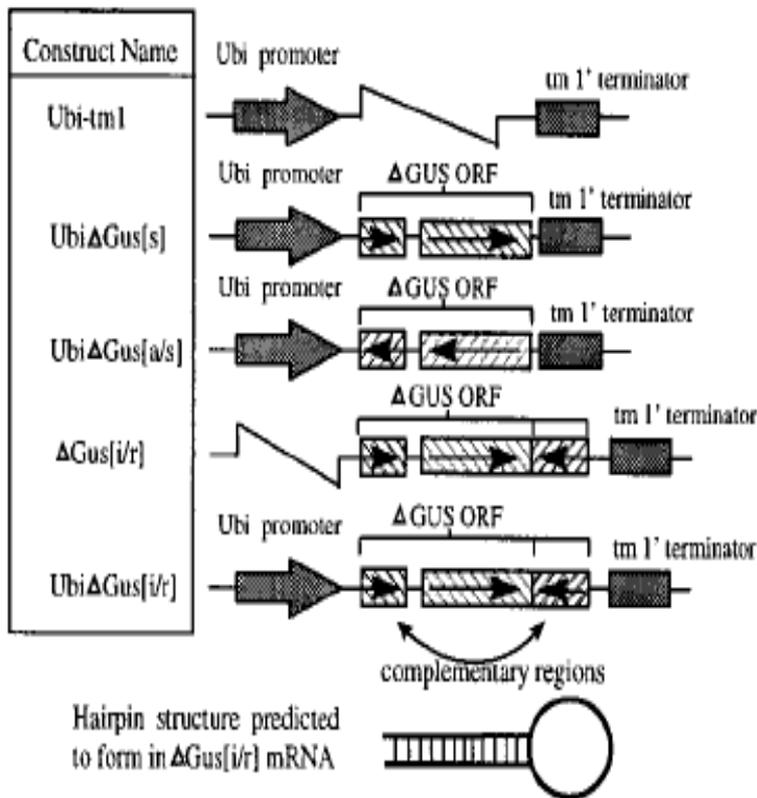


FIG. 6. Analysis of GUS expression of supertransformed rice callus. Transgenic rice tissue containing a single *Gus* transgene supertransformed with UbiΔGus[s], UbiΔGus[a/s], UbiΔGus[i/r], ΔGus[i/r], and the binary vector containing the *bar* gene but not the ΔGus gene. For more details see *Materials and Methods* and Fig. 1.

A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants

Andrew J. Hamilton and David C. Baulcombe* (1999)

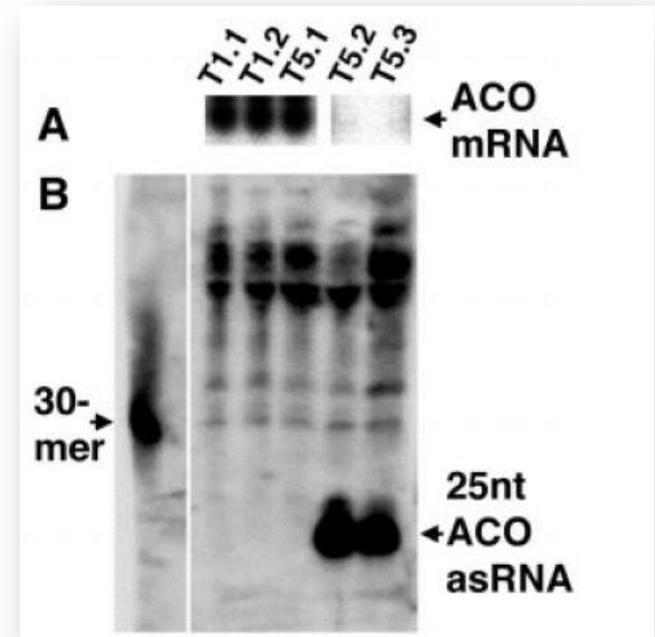
Chez la tomate

ACO: 1-aminocyclopropane-1-carboxylase oxydase

→ introduction d'un transgène:



Même chose pour lignées transgéniques GUS/GFP

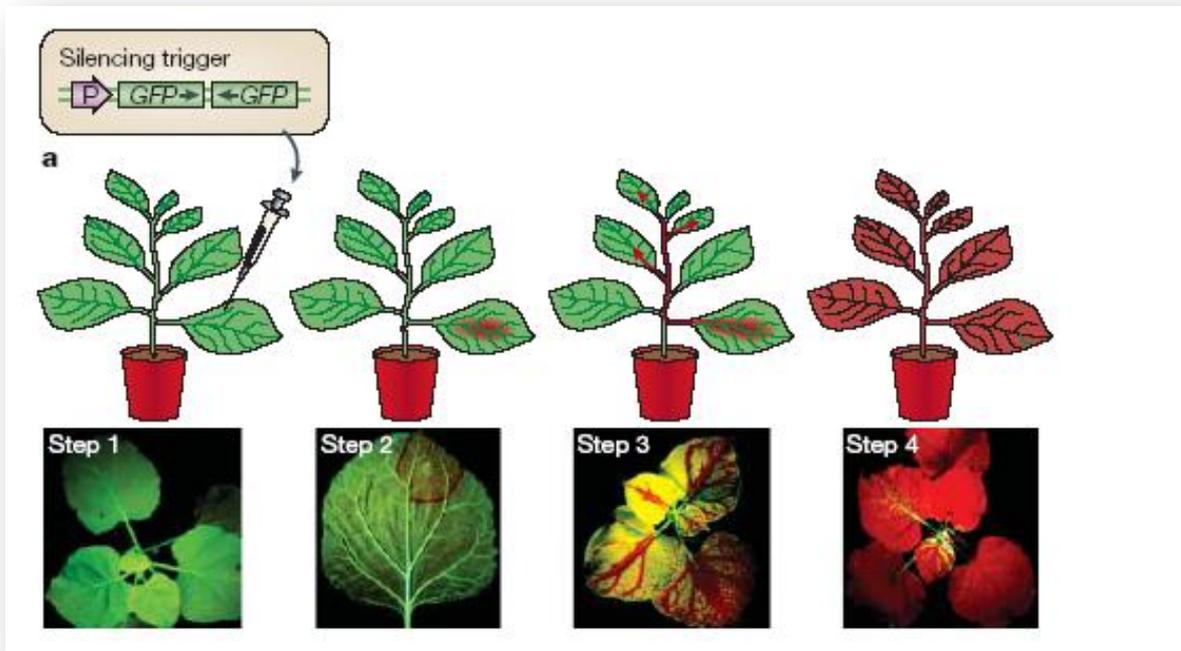


Le PTGS est associé la production de petits ARN (siRNA)

Effet des miRNA et siRNA

-évidence d'un transport (expériences de greffes)

-propagation d'un signal systémique



NATURE | VOL 389 | 9 OCTOBER 1997

Plante transgéniques exprimant la GFP

→ agroinfiltration avec une construction contenant la GFP

Observations sous UV:

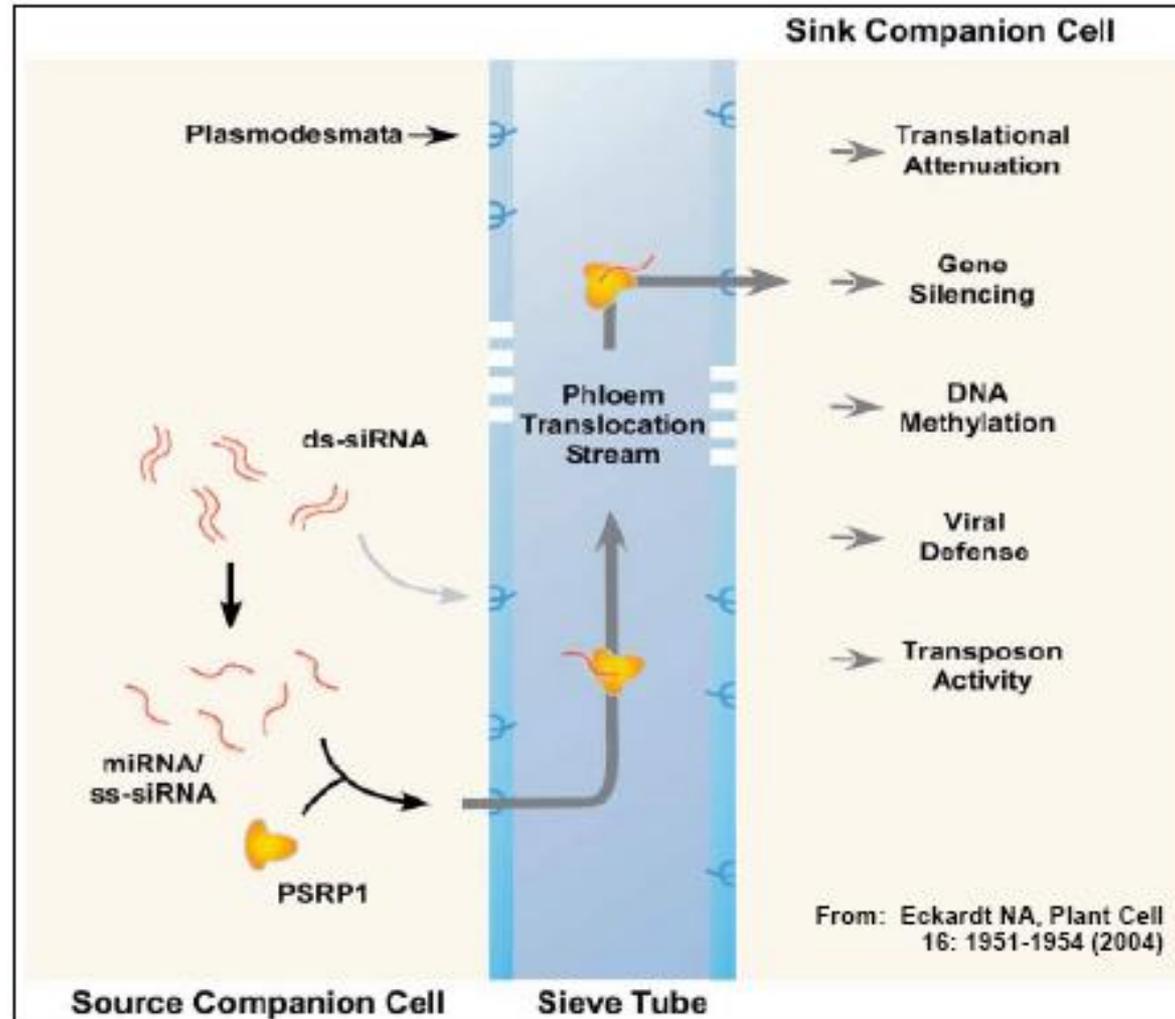
GFP = **Vert**

Inactivation partielle de l'expression du gène codant la

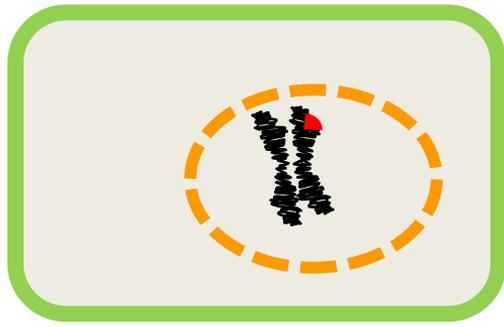
GFP=**jaune**

Chlorophylle = **rouge**

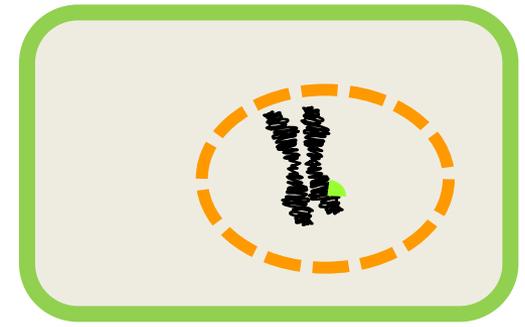
Systemic effect of miRNA and siRNA. Transport of a signal by the phloem:
ribonucleoproteins containing long siRNA of 24 to 26nt



TGS: Transcriptional Gene Silencing



Expériences visant à introduire plus d'un transgène dans une plante par croisement génétique.



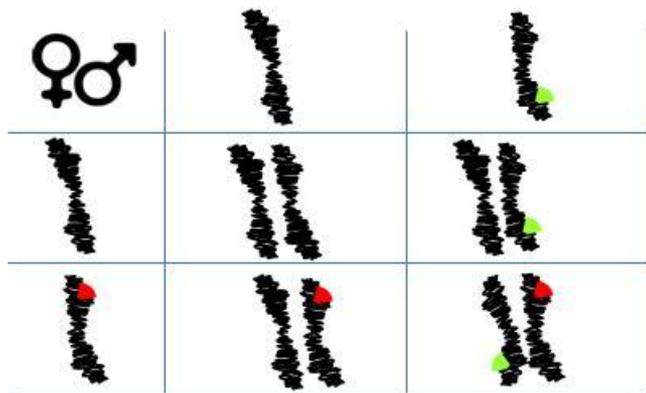
CaMV 35S pro : KAN

gène de résistance à la kanamycine

CaMV 35S pro : HYG

gène de résistance à l'hygromycine

Résultats attendus



Sélection sur kanamycine 50% KanR

Sélection sur hygromycine 50% HygR

Sélection sur Kan + Hyg: 25% KanR and HygR

→ Un des transgènes est inactivé dans la descendance portant les 2 gènes de résistance.

Résultats observés

♀♂		
		
		

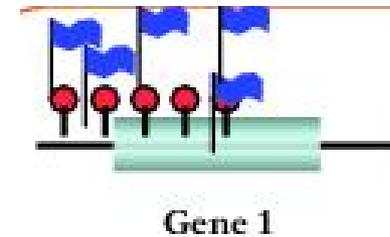
50% KanR

25% HygR

0% KanR et HygR

→ Lié à la méthylation de la région promotrice

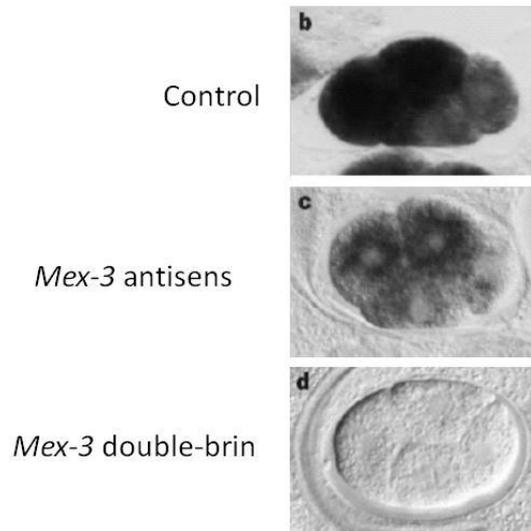
→ Phénomène héritable



Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire⁺, SiQun Xu⁺, Mary K. Montgomery⁺, Steven A. Kostas^{††}, Samuel E. Driver[‡] & Craig C. Mello[‡]

NATURE | VOL 391 | 19 FEBRUARY 1998



In situ hybridation: *ARN mex-3*



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"



Photo: Stanford

Andrew Z. Fire

🏆 1/2 of the prize

USA

Stanford University
School of Medicine
Stanford, CA, USA



Photo: UMASS

Craig C. Mello

🏆 1/2 of the prize

USA

University of
Massachusetts Medical
School
Worcester, MA, USA



- L'injection d'un ARN double brin spécifique d'un gène provoque la disparition de son transcrit
⇒ **Spécificité de séquence**
- L'effet ARNi peut se répercuter sur les cellules voisines
⇒ **Transport**
- Quelques molécules ARNdb sont suffisantes
⇒ **Amplification**
- Seul l'ARNdb d'un exon interfère avec le transcrit endogène
⇒ **Effet post-transcriptionnel**

1-Introduction

- Découverte chez les plantes et caractéristiques
- chez les autres eucaryotes?

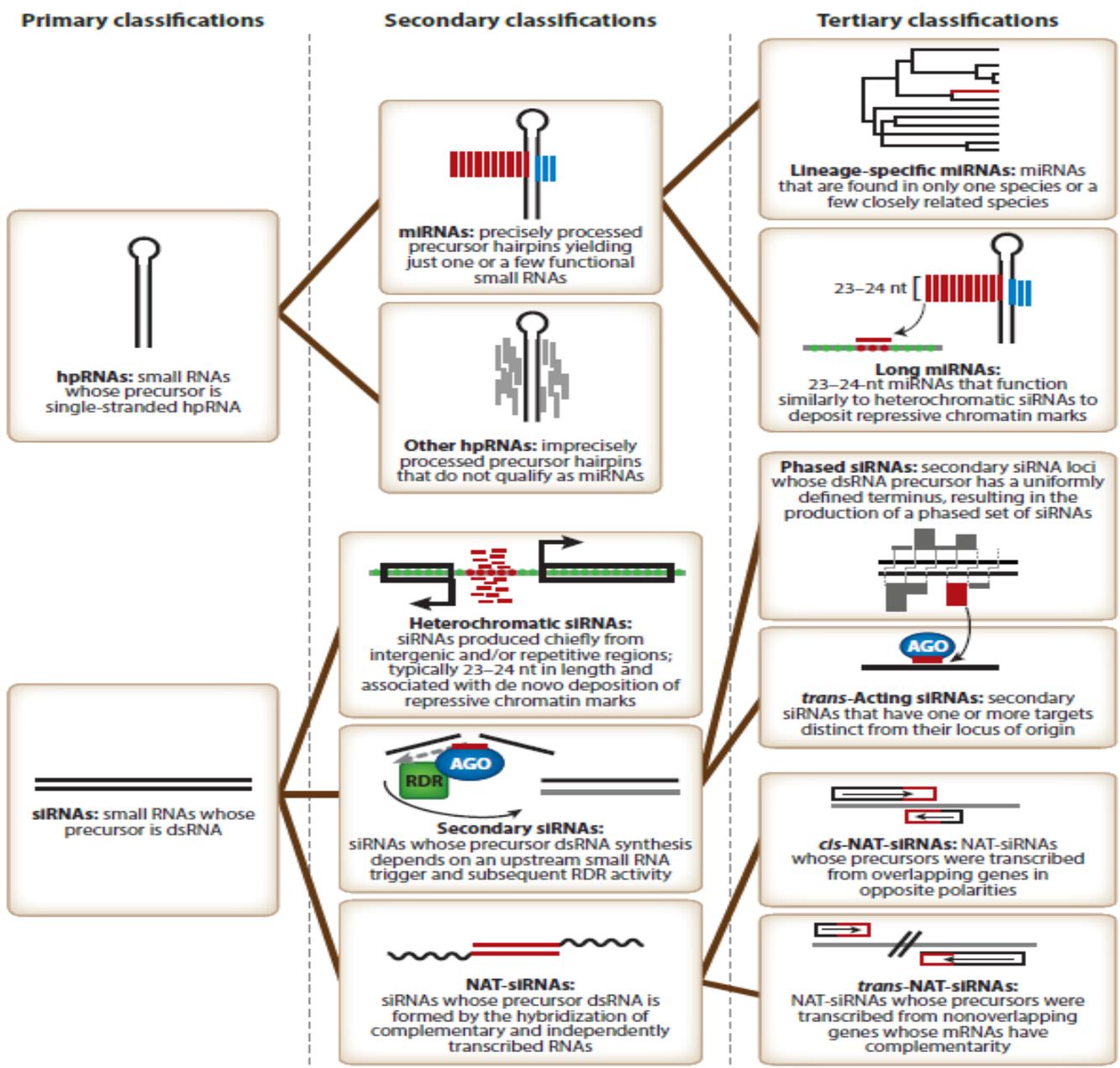
2-Classification, genèse et mode d'action

3-Cibles, fonctions

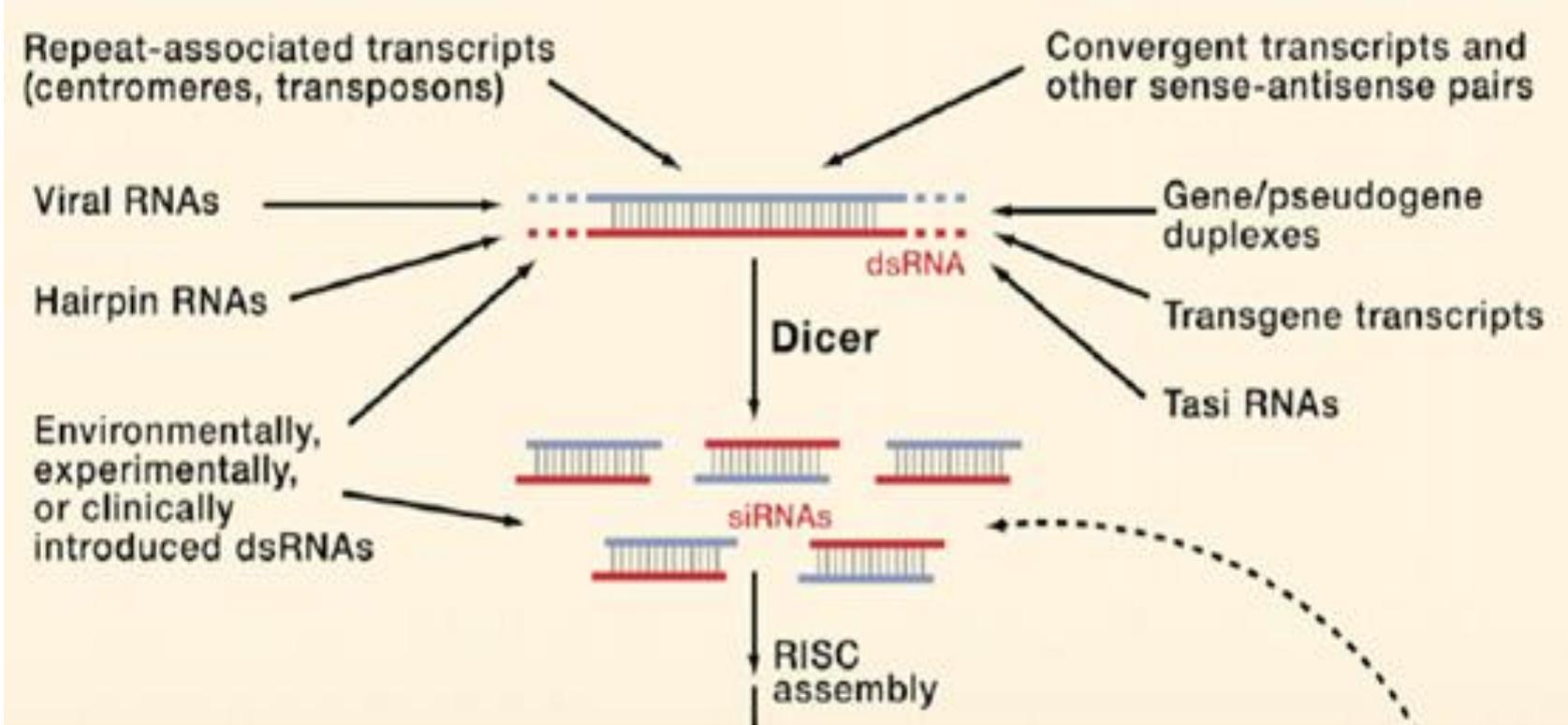
4-ARN interférence: outil de génomique fonctionnelle

ibiSc

Classification

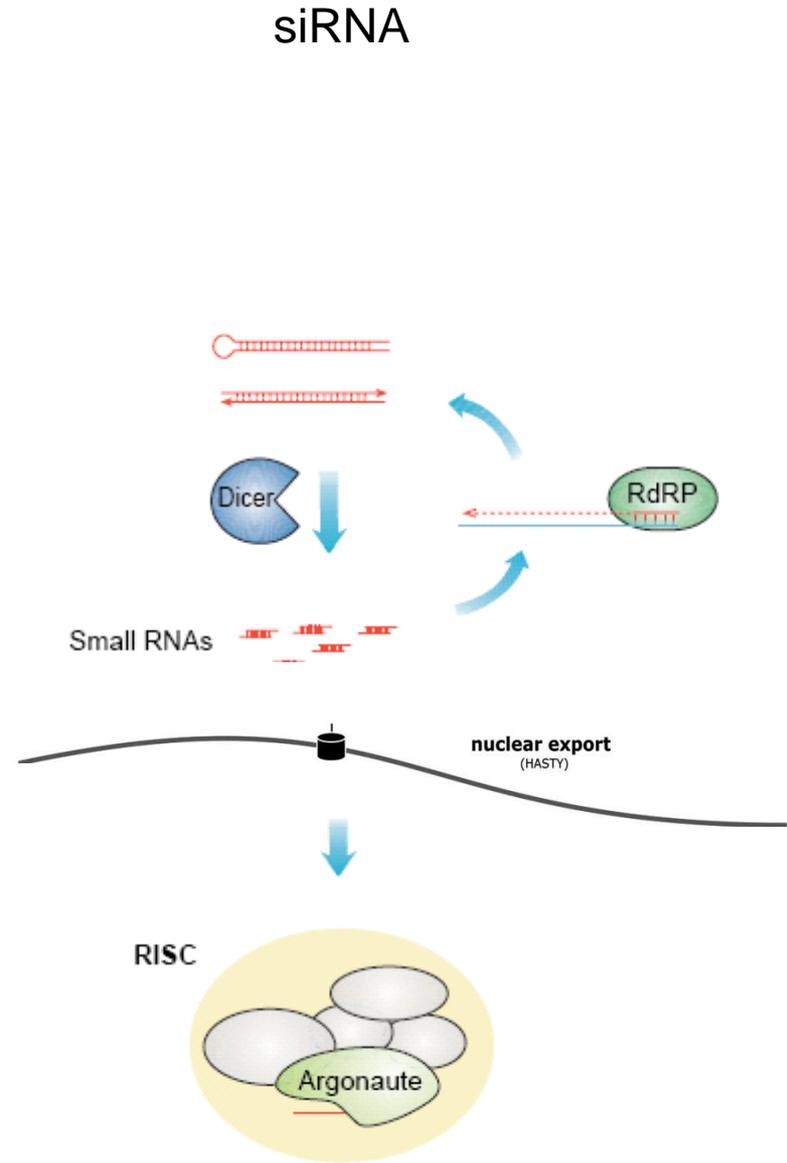
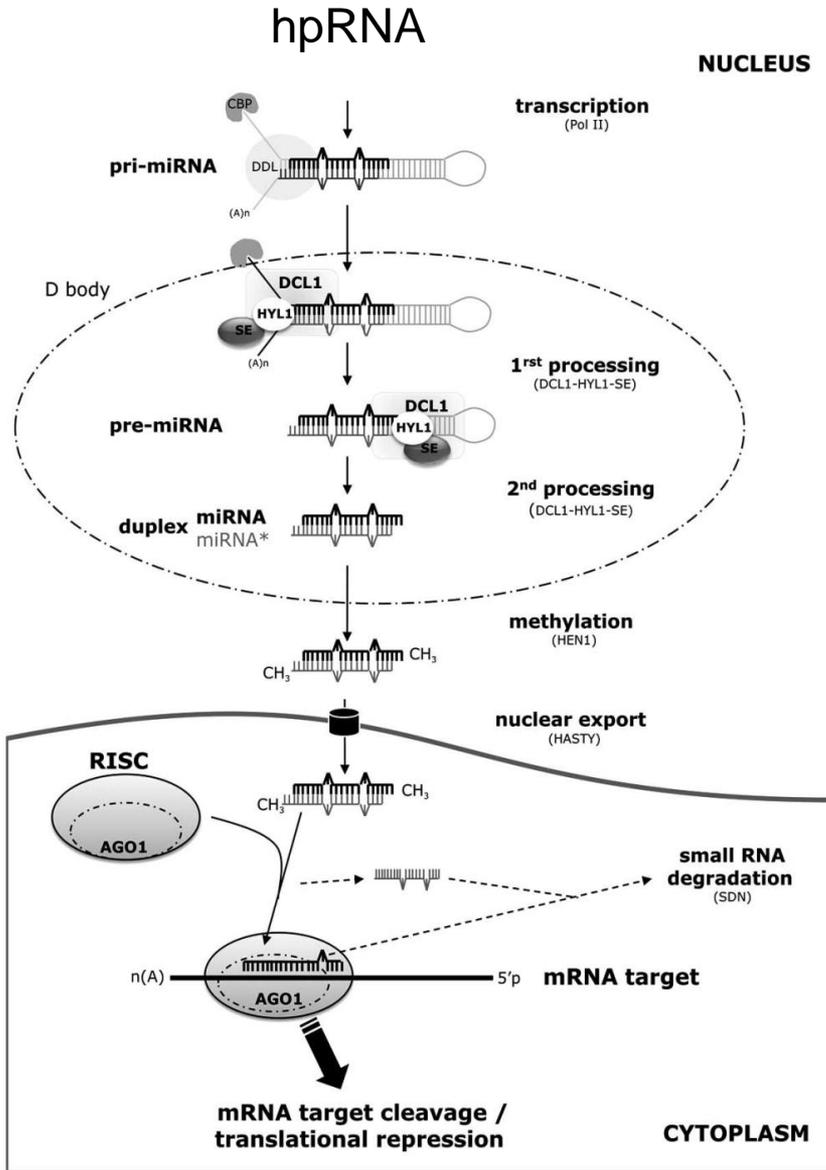


Sources d'ARN double brins pour les siRNA

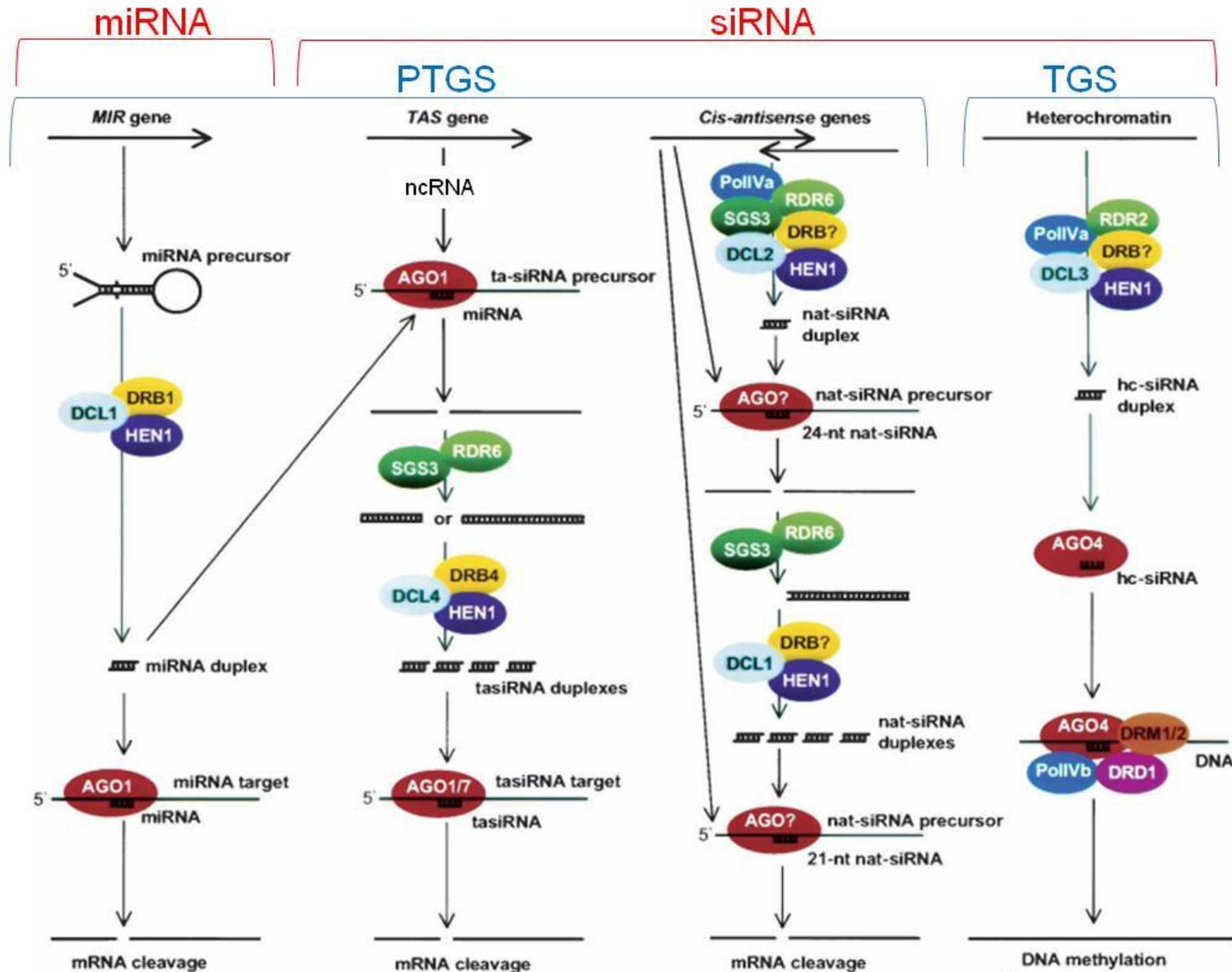


Carthew and Sontheimer, Cell (2009) 136, 642-655.

Genèse



Mécanismes développés par les plantes pour réguler l'expression des gènes par RNA interférence

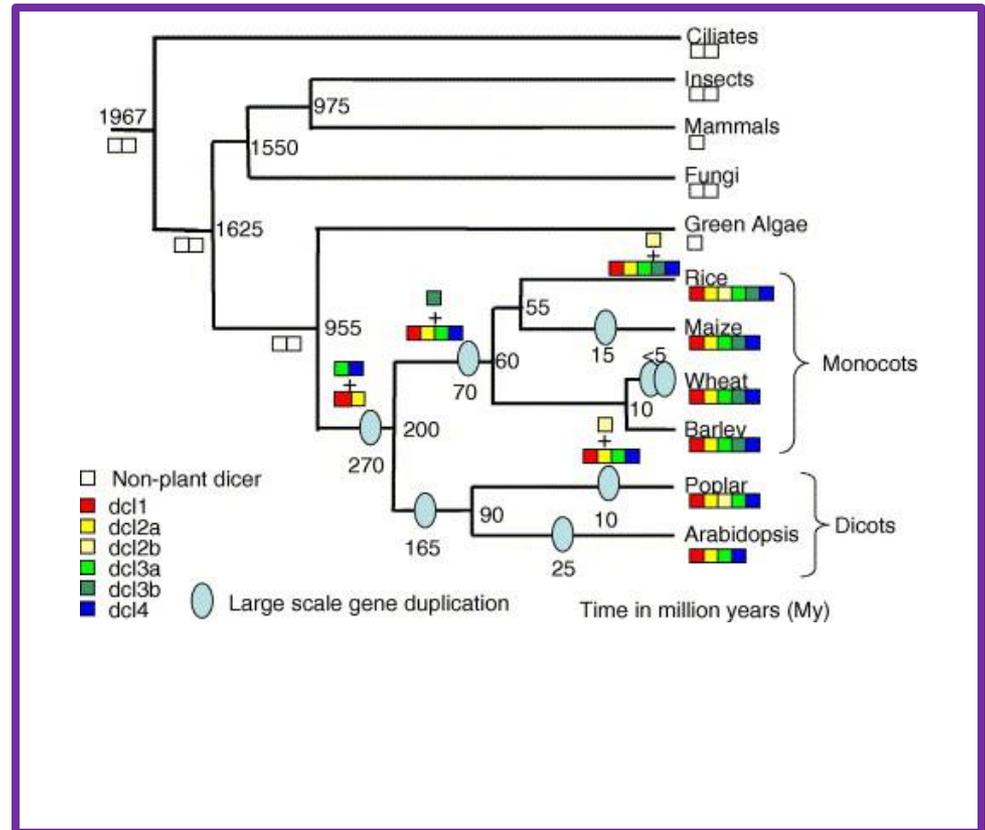


hpRNAs et siRNAs sont formés grâce à différentes enzymes

AtDCL1 produit les **miRNA**



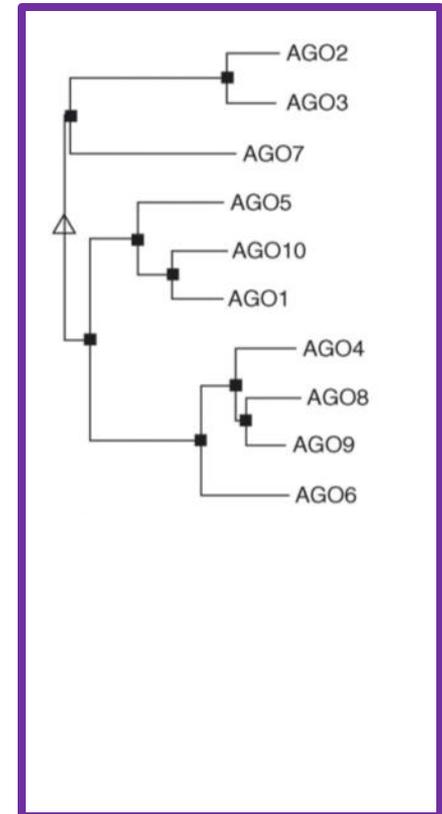
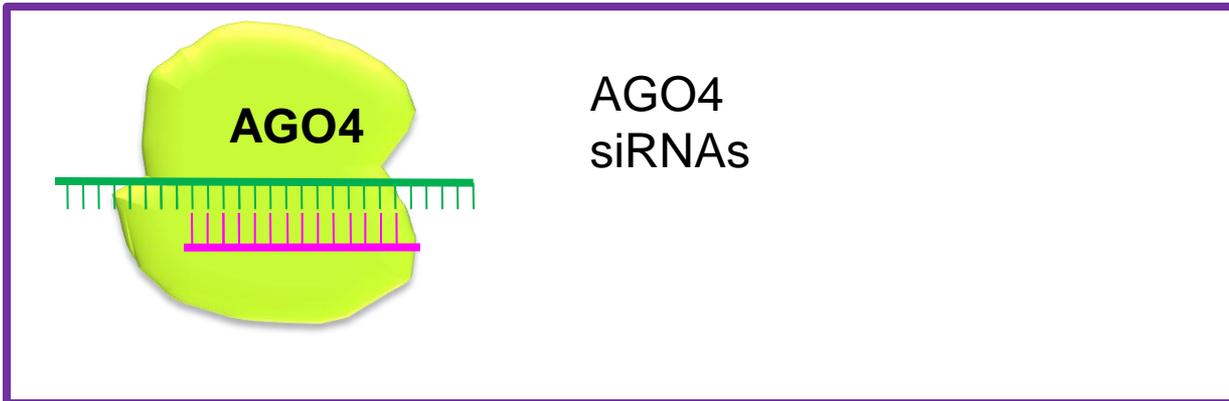
AtDCL2 - 4 produisent **siRNA**



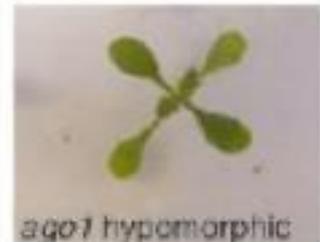
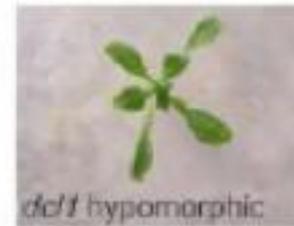
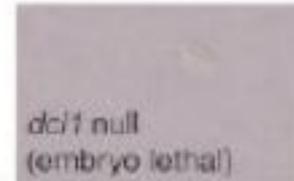
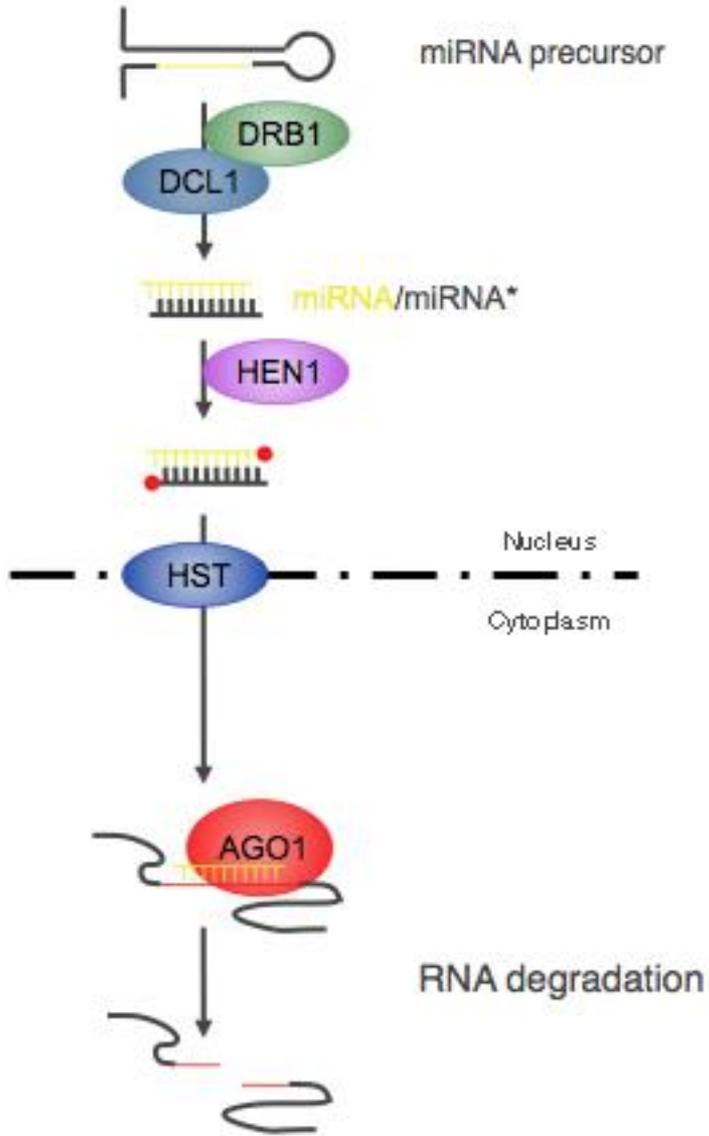
Les plantes ont des ARN polymerases ARN dépendantes spécifiques

Complex	Distribution	Function
ARN Polymerase I	Tous les eucaryotes	Production d'ARNr
ARN Polymerase II	Tous les eucaryotes	Production de ARNm, microRNA
ARN Polymerase III	Tous les eucaryotes	Production de ARNt, 5S ARNr
ARN Polymerase IV	Plantes terrestres	Production de siRNA
ARN Polymerase V	Angiospermes	Recrutement de AGO au niveau de l'ADN

hpRNAs et siRNAs sont associés avec différentes protéines AGO



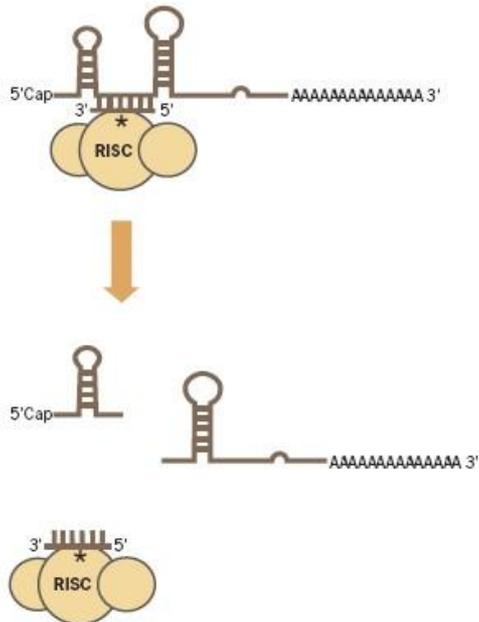
Mutants chez *Arabidopsis thaliana*



Differences dans les modes d'action des petits ARNs

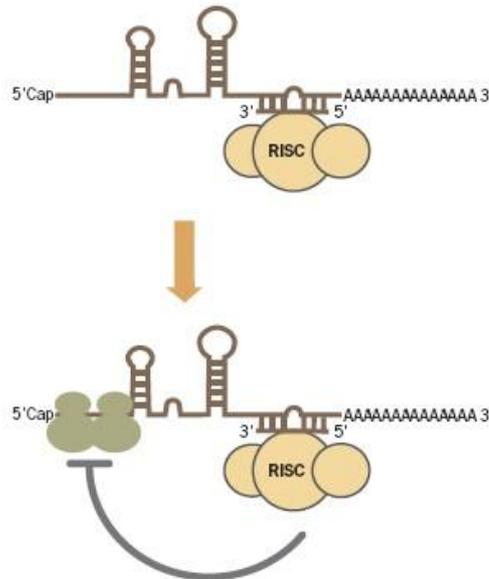
Common in plants

mRNA degradation



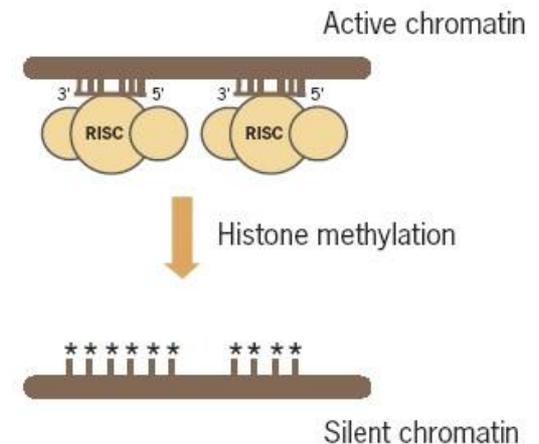
Common in animals

Translational regulation

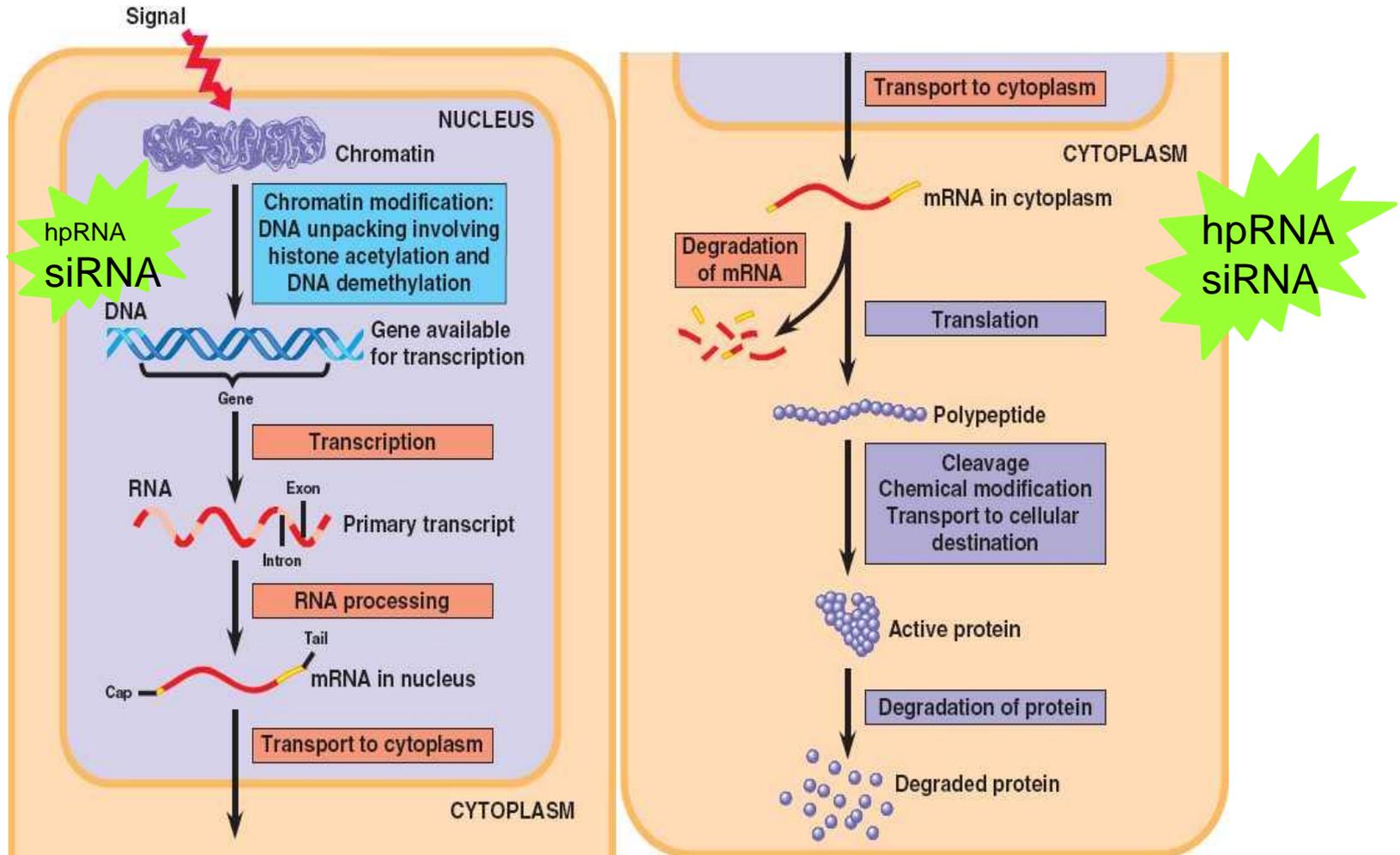


Common in yeast and plants, and possibly animals.

Transcriptional regulation



Différents niveaux de régulations de l'expression des gènes chez les eucaryotes



1-Introduction

- Découverte chez les plantes et caractéristiques
- chez les autres eucaryotes?

2-Classification-genèse et mode d'action

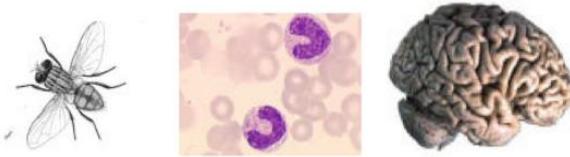
3-Identification, cibles, fonctions

4-ARN interférence: outil de génomique fonctionnelle

ibiSc

Identification

Approche ARNomique



Purification des petits ARN à partir d'échantillons biologiques (organismes, cellules ou organes)

Obtention de la séquence des petits ARN
gcacauuacacggucgaccucu

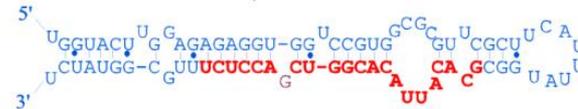
Repliement en épingle à cheveux?

Production d'un ARN de 21 nt ?

Approche *in silico*



Recherche à l'aide de logiciels informatiques de séquences d'ADN conservées capables de se replier en "une épingle à cheveux"



Validation expérimentale du miARN

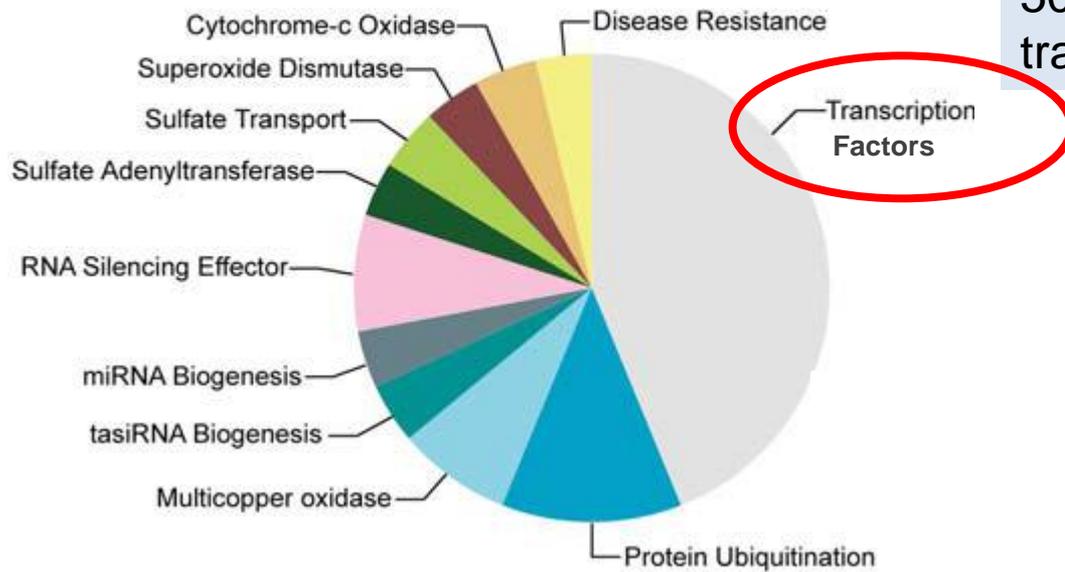
Etude du miARNome (puces ADN)

Recherche des ARNm-cible (recherche *in silico*)

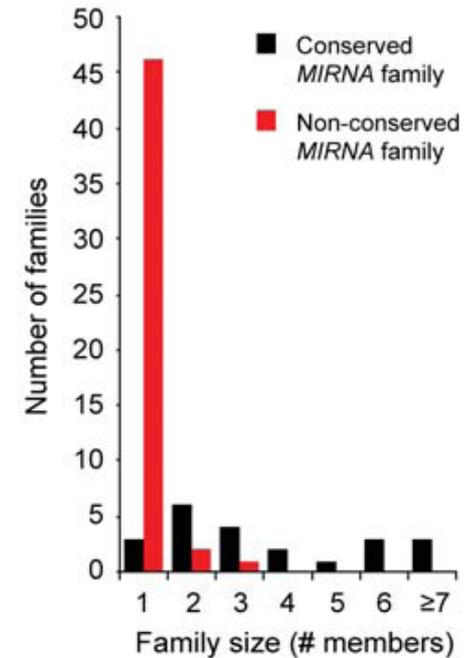
Fonctions biologiques (Génétique et génétique inverse)

Cibles de miRNA

Conserved miRNA target functions



50% ciblent des facteurs de transcription



Subfunctionalization of miRNAs

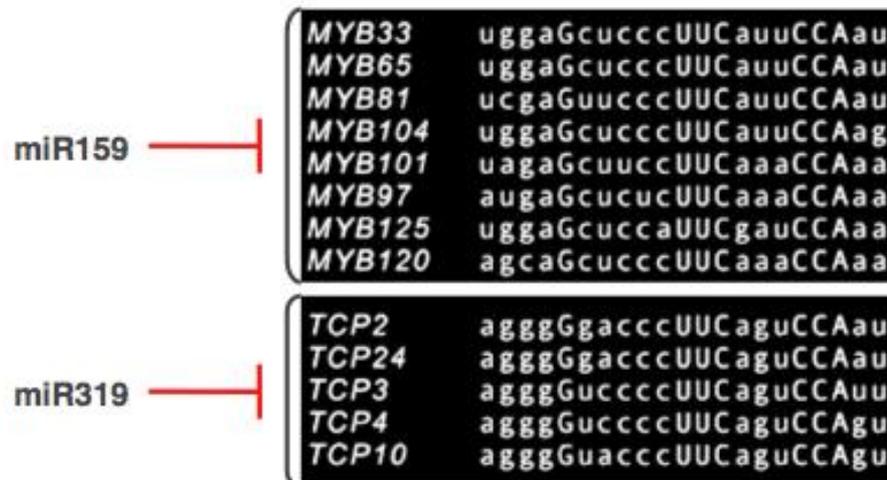


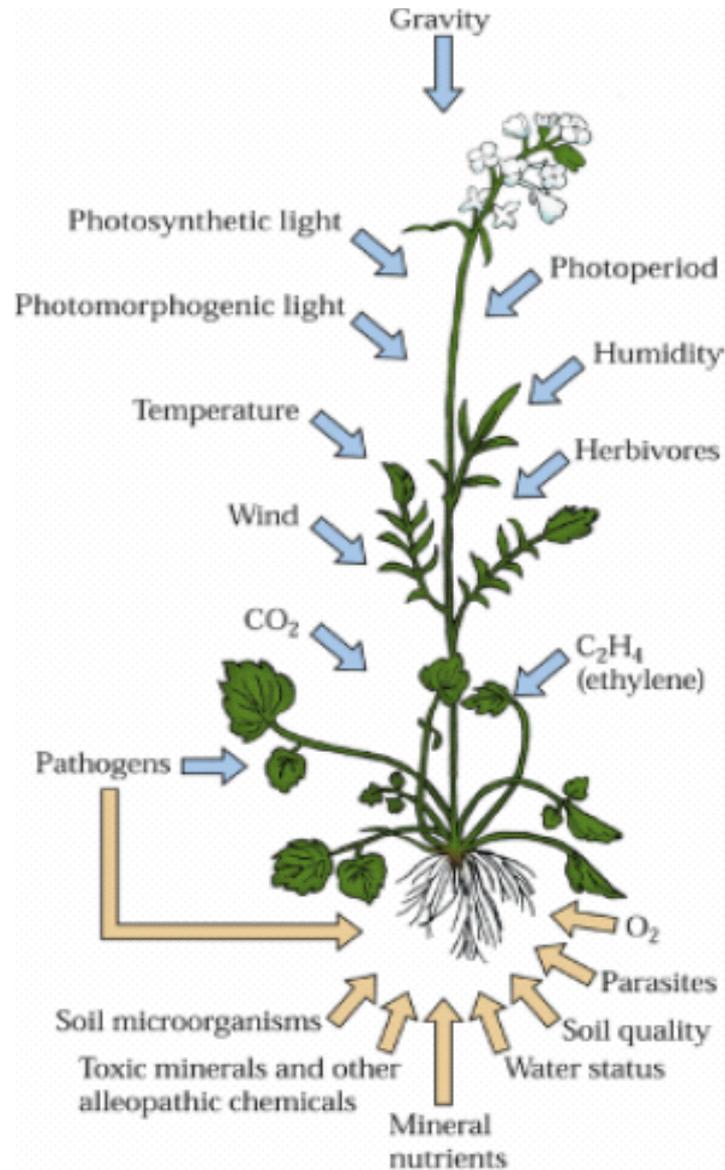
Table 1. miR159/miR319 Families

miRNA	Sequence	Times Cloned ^a	Overexpression Phenotype ^b		
			Cotyledon Epinasty	Crinkled Leaves	Stamen Defects
miR159a	.uUUGGAuUGAAGGGAGCUCua	19,940 (4,306)	-	-	~48%
miR159b	.uUUGGAuUGAAGGGAGCUCuu	1,982 (387)	-	-	~46%
miR159c	.uUUGGAuUGAAGGGAGCUCcu	21 (3)	-	-	-
miR319a	..UUGGAcUGAAGGGAGCUCcc/	6 (0/145 (45)	Severe (>90%)	Strong (>90% of T ₁)	~33%
miR319b	..UUGGAcUGAAGGGAGCUCccu		Severe (>90%)	Strong (>80% of T ₁)	Not determined
miR319c	.uUUGGAcUGAAGGGAGCUCcu/ ..UUGGAcUGAAGGGAGCUCcuu	12 (3/17 (8)	Moderate (>50%)	Mostly Normal	~24%

^a<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>; total numbers from all genotypes and tissues; small RNAs unambiguously assigned to wild-type given in parentheses.

^bAt least 80 T₁ plants per construct.

RNA interférence et adaptation des plantes à l'environnement



Les cibles des MicroARNs chez *Arabidopsis*

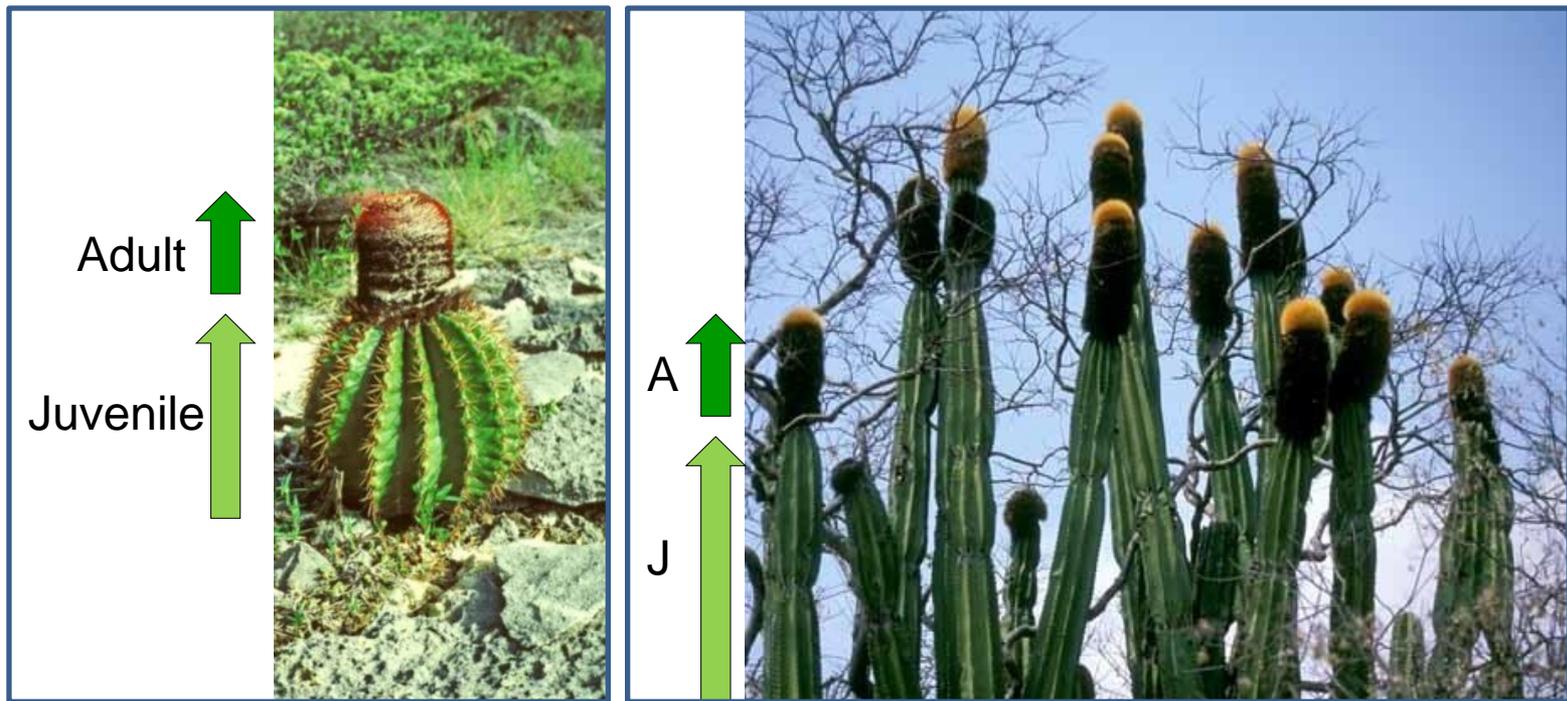
microRNA	Target Family	Predicted Target Genes	No. of Mismatches	Validated Cleavage Targets
miR156	SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP)-like proteins	10 <i>SPL</i> genes	1-2	<i>SPL2</i>
miR157	SBP-like proteins Putative DEAD-box RNA helicase Unknown proteins	9 <i>SPL</i> genes At5g08620 At1g22000, At3g47170	1-3 3 3	<i>SPL2</i>
miR158	Unknown protein	At1g64100	3	
miR159a	MYB transcription factors Unknown protein	5 <i>MYB</i> genes At1g29010	2-3 3	<i>MYB 33, MYB 65</i>
miR159b	MYB transcription factors	3 <i>MYB</i> genes	3	
miR160	Auxin Response Factors	<i>ARF10, ARF16, ARF17</i>	1-3	<i>ARF10, ARF17</i>
miR161	Pentatricopeptide repeat proteins	9 genes	3	
miR162	DICER	<i>DCL1</i>	1-nt bulge	<i>DCL1</i>
miR163	SAM-dependent methyltransferases	5 genes	0-2 with 1-nt bulge	
miR164	NAC domain proteins	<i>CUC1, CUC2, NAC1, 2 others</i>	2-3	<i>CUC1, CUC2</i>
miR165	HD-Zip transcription factors	<i>PHV, PHB, REV, ATHB-8</i>	3	<i>PHV, REV</i>
miR166	HD-Zip transcription factor	<i>ATHB-15</i>	3	
miR167	Auxin response factors	<i>ARF6, ARF8</i>	3-4	<i>ARF8</i>
miR168	ARGONAUTE	<i>AGO1</i>	3	<i>AGO1</i>
miR169	CCAAT-binding factor (CBF)-HAP2-like proteins	At1g17590, At1g54160	3	
miR170	GRAS domain transcription factors (SCARECROW-like)	<i>SCL6-II, SCL6-III, SCL6-IV</i>	2	
miR171	GRAS domain transcription factors (SCARECROW-like)	<i>SCL6-II, SCL6-III, SCL6-IV</i>	0	<i>SCL6-III, SCL6-IV</i>
miR172	APETELA2-like transcription factors	<i>AP2, 3 AP2-like genes</i>	1-3	<i>AP2, 3 AP2-like genes</i>

From: Bartel & Bartel, *Plant Phys* 132: 709-717 (2003); Mallory & Vaucheret, *Curr Op Pl Biol* 7: 120-125 (2004)

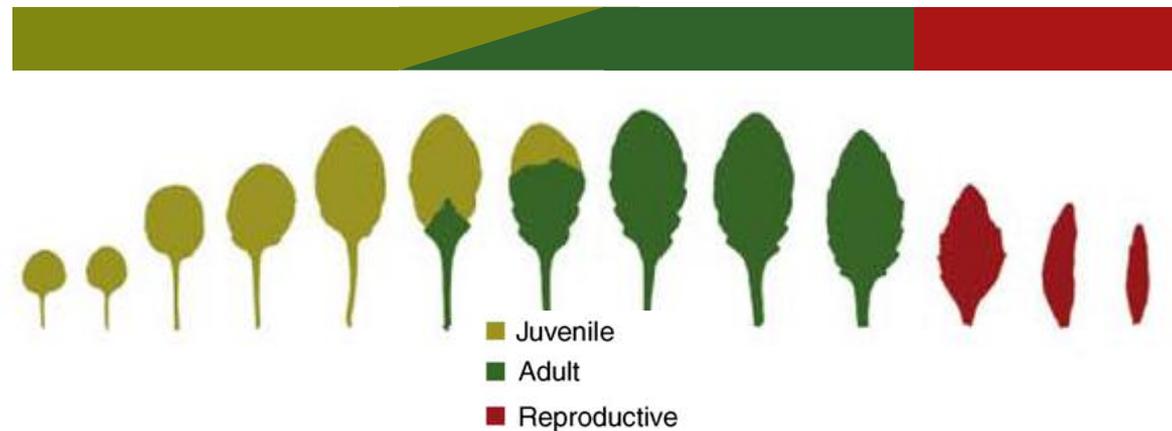
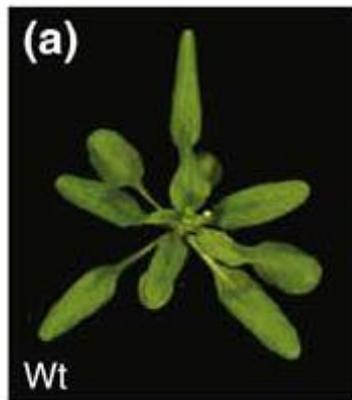
Rôles biologiques des micro ARNs chez *Arabidopsis*

microRNA	Target genes encode	Biological role validated by experimental evidence
miR172	AP2 & related TFs	Floral development & flowering time
miR156/157	SPL2 & related TFs	Floral meristem identity
miR164	CUC1 & related TFs	Shoot apical meristem formation & organ separation
miR165/166	RHV & related TFs	Axial meristem initiation & leaf development
miR-JAW	TCP4 & related TFs	Leaf development & embryonal patterning
miR159	MYB33 & related TFs	Leaf development
miR170/171	SCL6-III & related TFs	Root radial patterning
miR160	ARF10 & related TFs	Auxin response & development
miR167	ARF6 & related TFs	Auxin response & development
miR162	DCL1 Dicer-like RNase III	Cleavage of dsRNA, microRNA biogenesis
miR168	ARGONAUTE	Part of the RISC complex, microRNA biogenesis

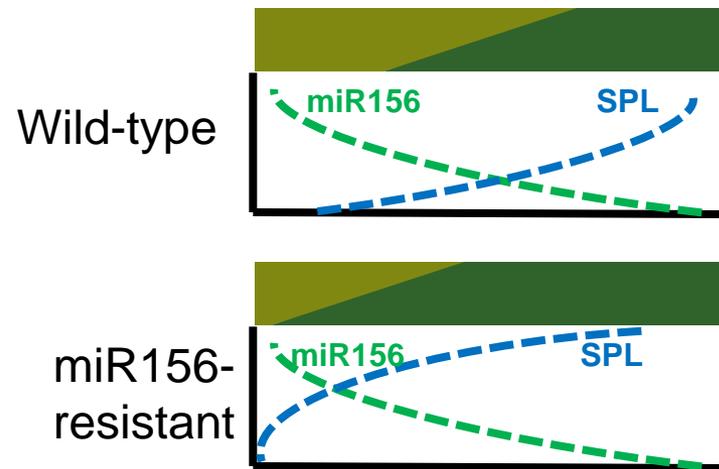
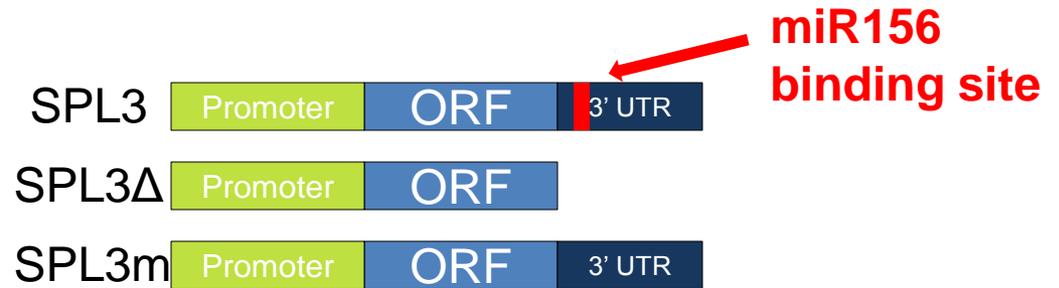
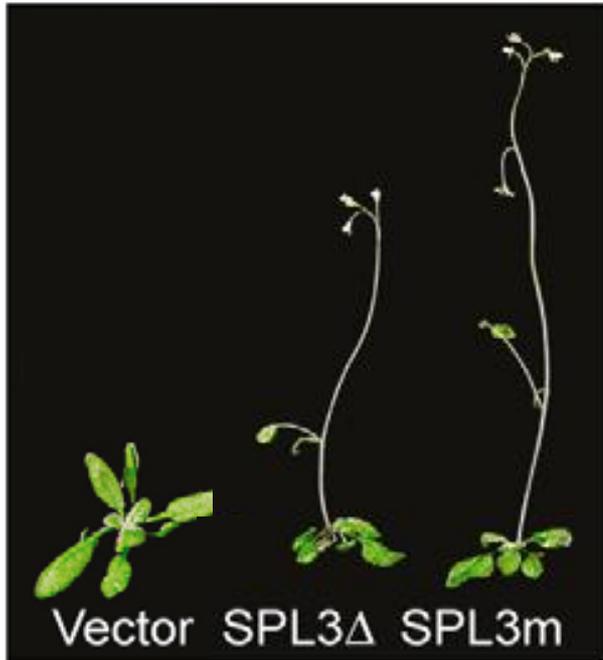
Exemple: miRNAs et changement ds les phases de développement



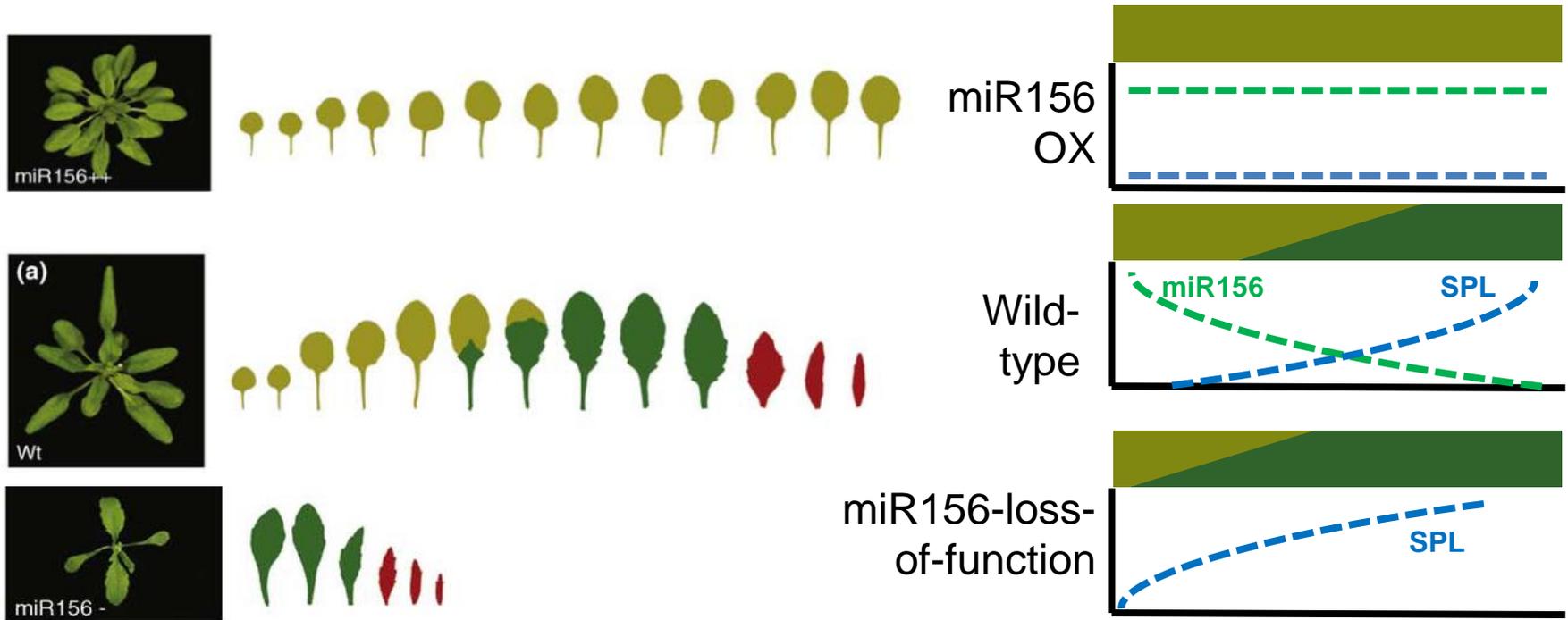
Chez Arabidopsis, ces changements de phase induisent des modifications au niveau de la forme des feuilles et la présence de trichome



miR156 cible les gènes *SPL*, impliqués dans ce changement de phase



Effet de la surexpression ou de l'inactivation de l'expression de miR156



1-Introduction

- Découverte chez les plantes et caractéristiques
- chez les autres eucaryotes?

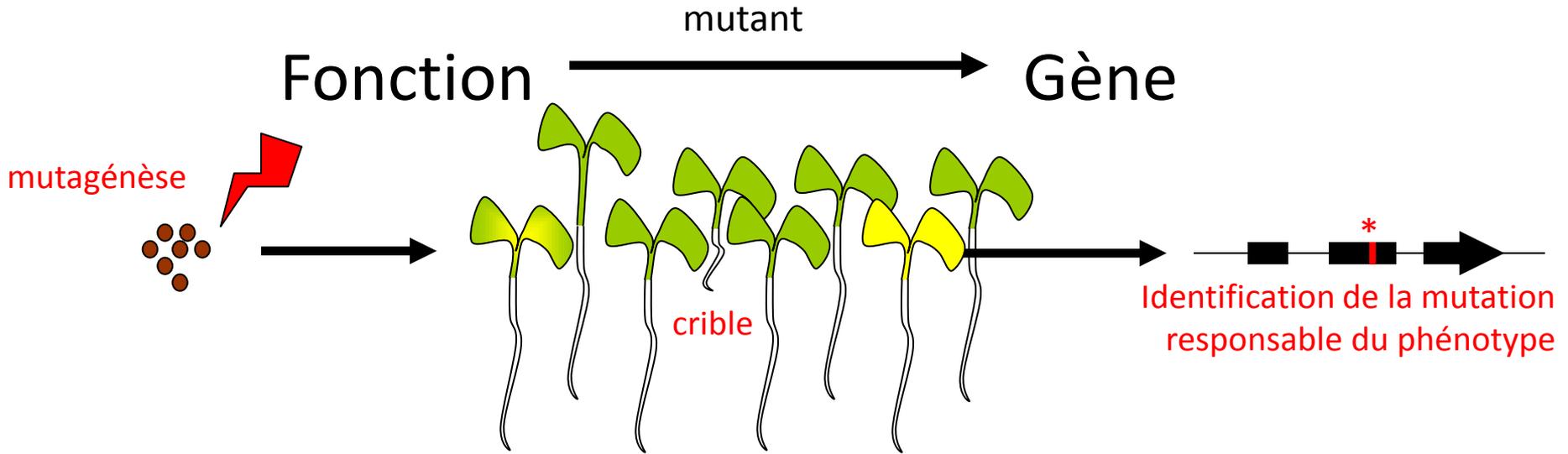
2-Classification-genèse et mode d'action

3-Identification, cibles, fonctions

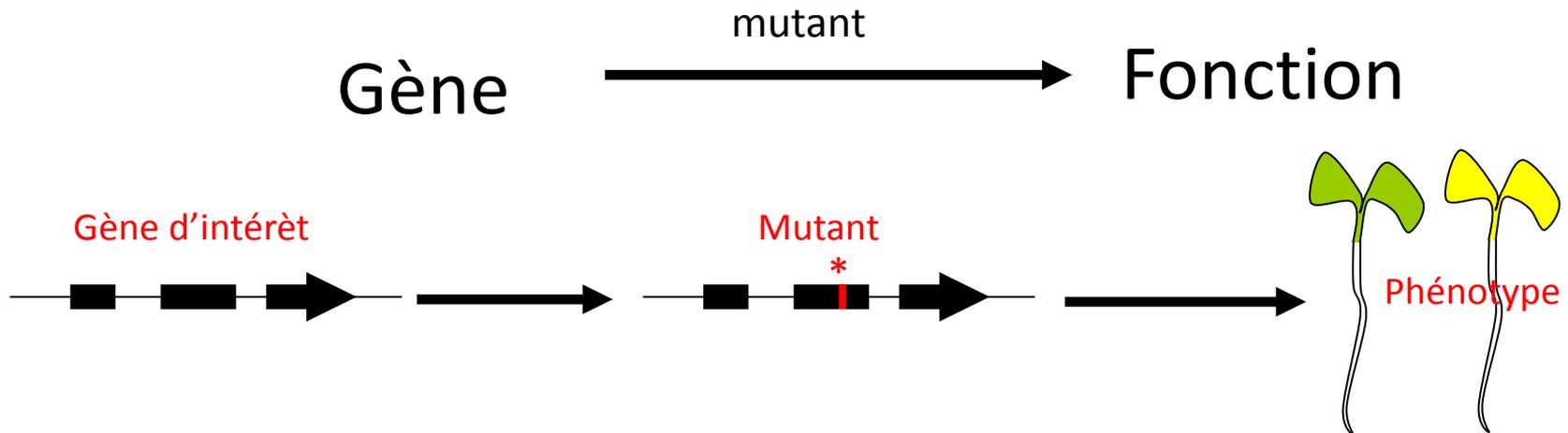
4-ARN interférence: outil de génomique fonctionnelle

ibiSc

Génétique classique : recherche d'un mutant sur la base du phénotype



Génétique inverse : recherche d'un mutant dans un gène donné



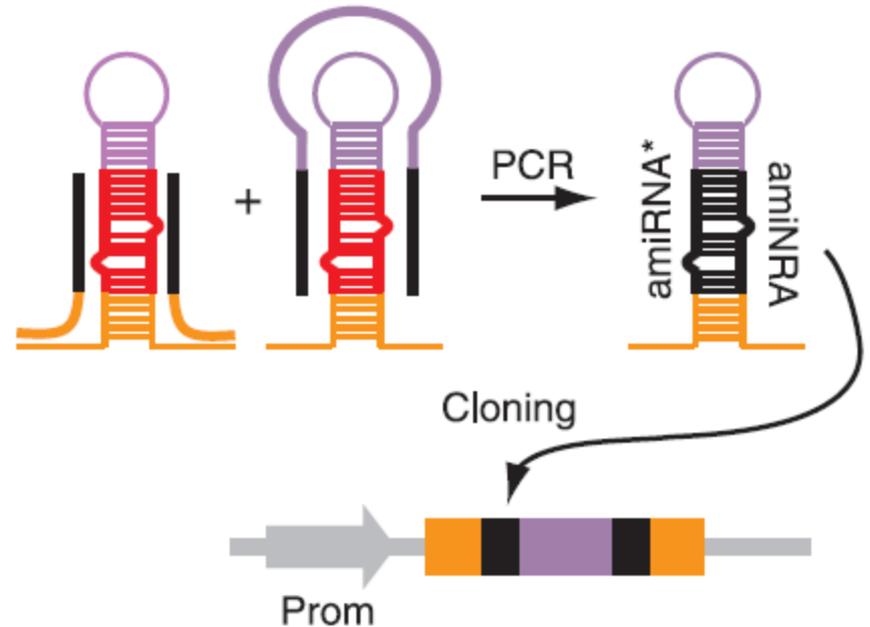
microRNA artificiel (amiRNA)

Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs

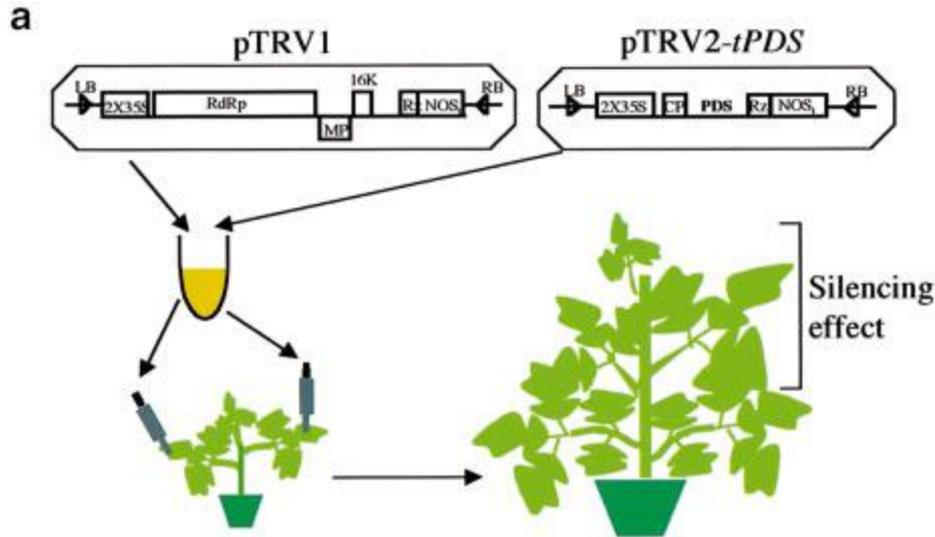
Stephan Ossowski†, Rebecca Schwab†,‡ and Detlef Weigel*
The Plant Journal (2008) 53, 674–690

Principe:

- exploite un précurseur de microRNA connu avec des caractéristiques structurales connues (boucles et gap)
- changement du duplex d'origine (miRNA/miRNA*) par une séquence désirée par PCR
- fonctionne très bien chez animaux et végétaux
- très forte accumulation du miRNA produit

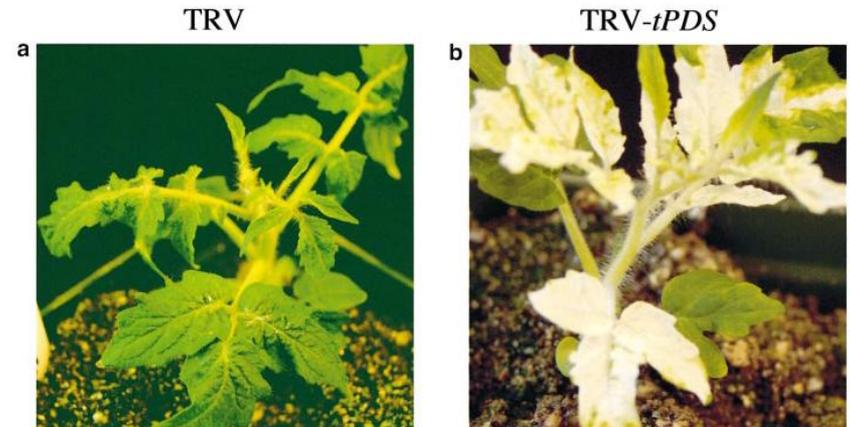
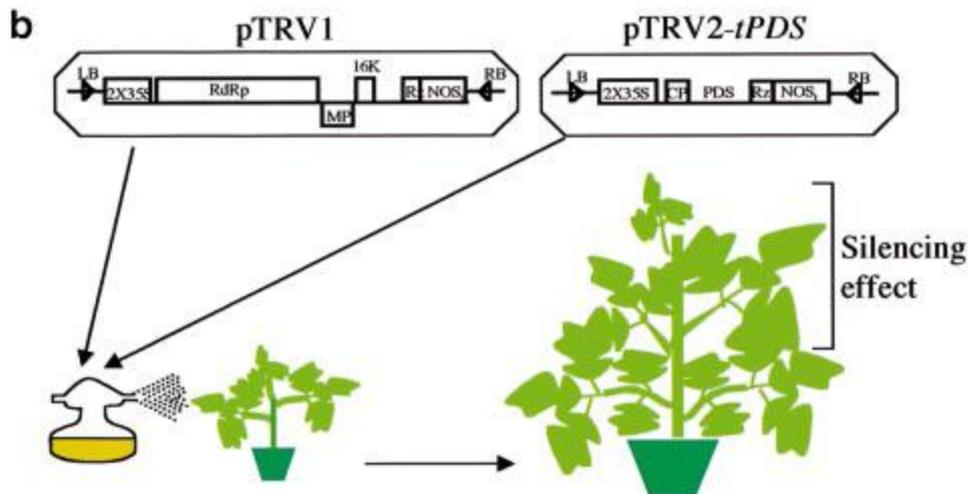


VIGS: Virus Induced Gene silencing

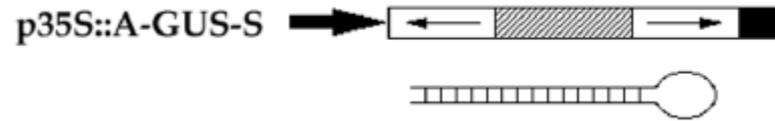


Virus-induced gene silencing in tomato

Yule Liu, Michael Schiff and S. P. Dinesh-Kumar; *The Plant Journal* (2002) 31(6), 777±786

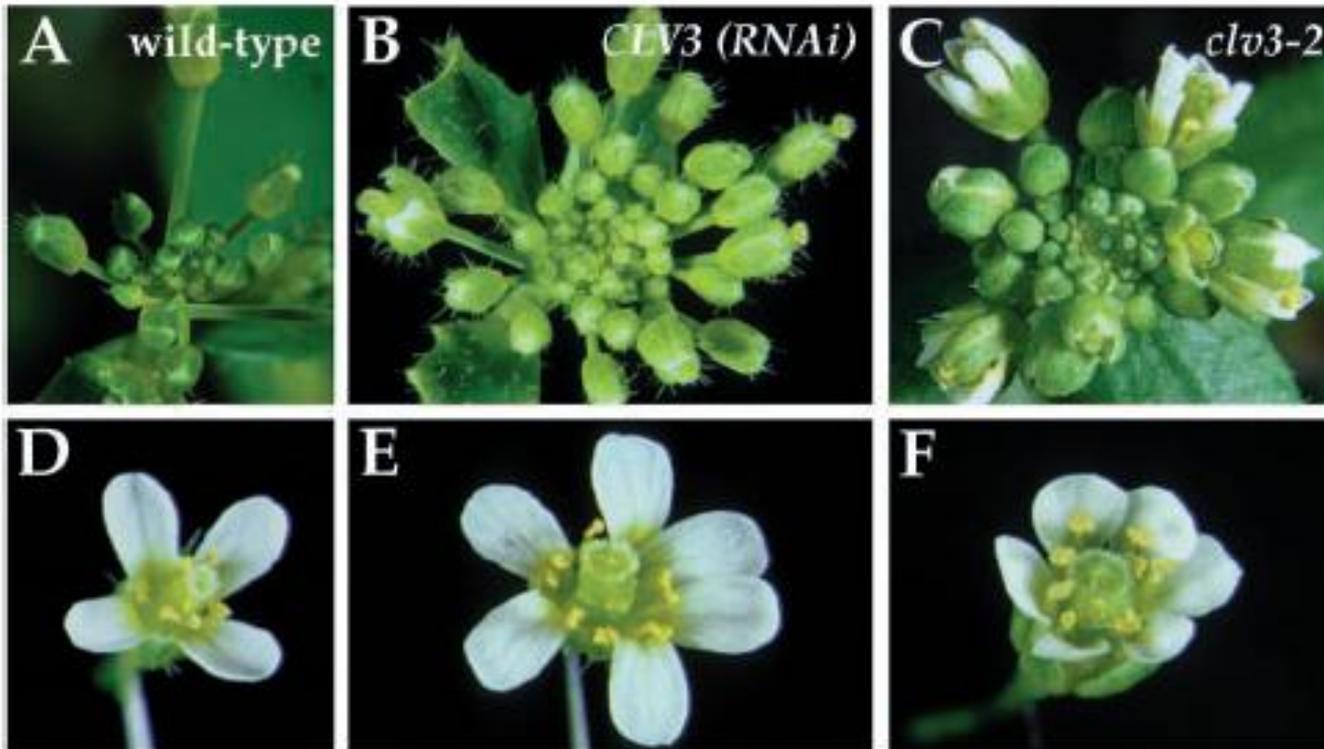


Expression d'ARN tige-boucle artificiel: hpRNAi

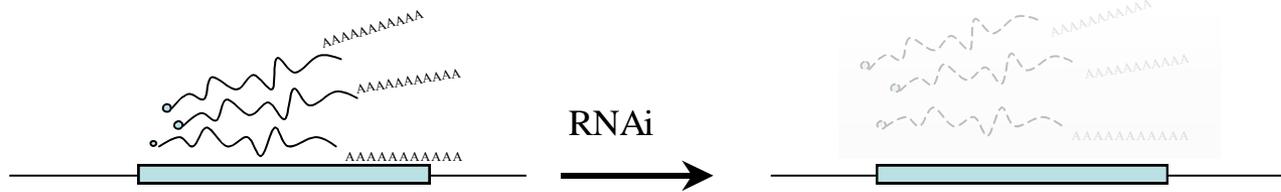


Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*

Chiou-Fen Chuang and Elliot M. Meyerowitz* PNAS | April 25, 2000 | vol. 97 | no. 9 | 4985-4990

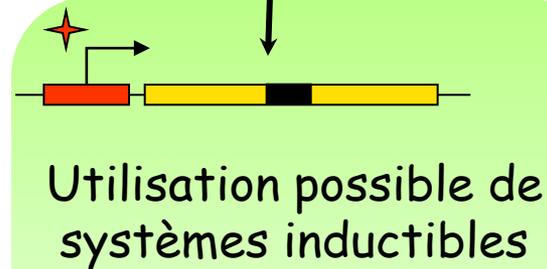
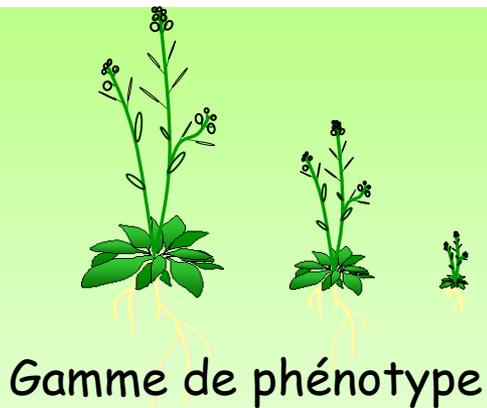


RNA interference



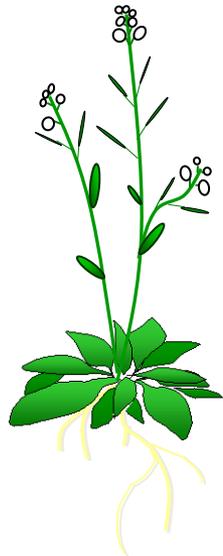
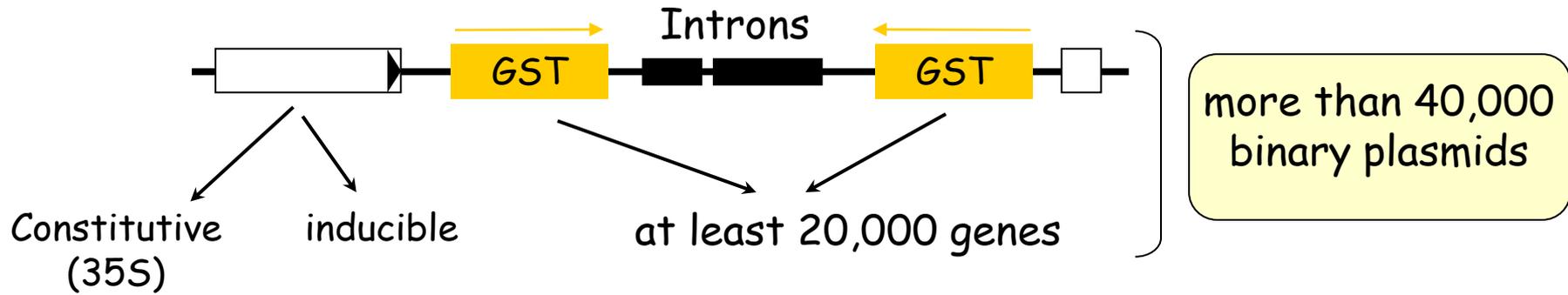
Peu de transformants

-Utilisable en cas d'absence de collection de mutants
-inactivation de famille de gènes





Arabidopsis genomic RNAi knock-out line analysis

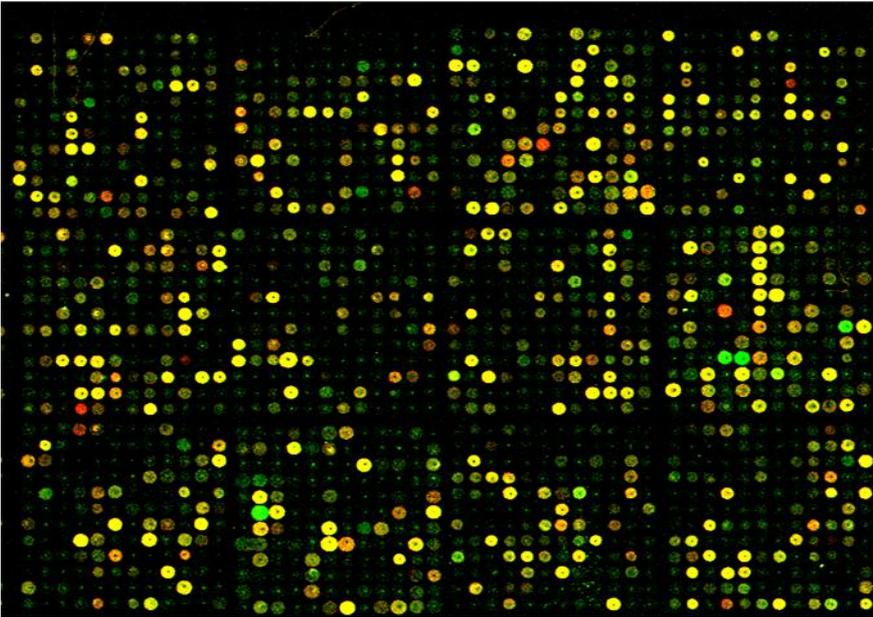


Transform
Arabidopsis with 4,000
of these plasmids



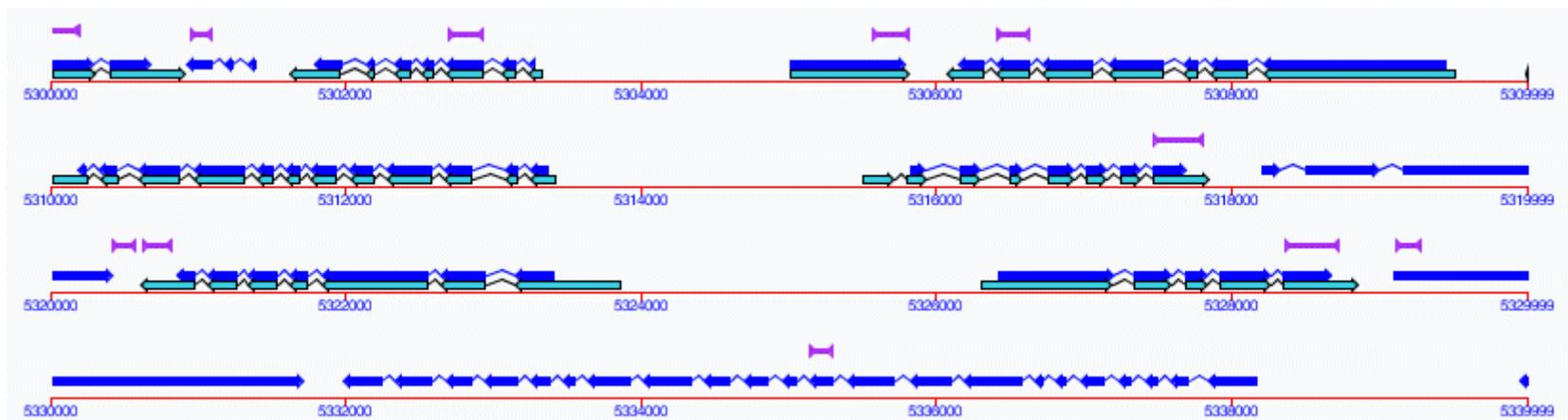
CATMA

A Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray



24,576 GSTs www.catma.org

- 150 to 500 bp genomic fragments amplified by PCR
- selected to share no more than 70% identity with any other *Arabidopsis* sequence



Inducible Silencing systems: éthanol, cuivre, ectdisone, dexaméthasone...

Exemple: dans le cadre de Agrikola, développement par le CSIRO (Australie) d'un système RNAi inducible utilisant le dexaméthasone. Le vecteur pOpOff utilise un promoteur pOp6 (developed by Ian Moore, University of Oxford) et un facteur de transcription synthétique, LhGR sous contrôle du promoteur 35S.



No Dex



Dex

Random T1 plants 7 days after transfer to media with or without Dex

RNAi-lines targeting ADP-Glucose pyrophosphorylase

AGPase: key enzyme in the starch biosynthesis pathway
consists of two large (regulatory; *adg2*) and two small (catalytic; *adg1*)
subunits

adg1: loss of function mutant has no
measurable AGPase activity in leaves
and less than 20% of wildtype starch



EMS

adg2: loss of function mutant has
20% of normal AGPase activity in
leaves, no visible phenotype



RNAi



adg1 RNAi: T2 and T3 plants from 6 individual T1 lines

