

Présentation de la Thèse de Philippe LAPORTE

Rôle des ARN non-codants pour des protéines (npcRNAs) dans la régulation de l'architecture de la racine¹

François Blondon². – Les plantes ont la capacité de faire varier l'architecture de leurs racines afin de s'adapter au mieux aux conditions environnementales au niveau du sol. Ainsi les contraintes abiotiques aussi bien que biotiques sont à l'origine de modulations de la croissance des racines primaires et de l'organogenèse des racines latérales. Les Légumineuses possèdent en outre la particularité de développer deux types d'organes latéraux, les racines latérales et les nodosités symbiotiques. Ces dernières sont caractérisées par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via une interaction mutualiste avec les bactéries du Genre *Rhizobium*. Ces dernières années, de nombreux ARN ne codant pas de protéines (npcRNA) sont apparus comme étant de nouveaux régulateurs du développement et de la réponse aux stress. Ces ARN, dit riborégulateurs, incluent une large diversité de petits ARN (mi/tasiRNA), ainsi que d'autres classes d'ARN dont les mécanismes d'action restent largement inexplorés.

Lors de ce travail de thèse, sont explorés le rôle et les mécanismes d'action de certains npcRNA concernant l'architecture de la racine chez *Medicago truncatula*. Tout d'abord, est identifié et caractérisé le précurseur du miRNA 166 (*MtMIR166a*), un npcRNA contenant deux copies en tandem du MIR166 au sein d'une seule unité transcriptionnelle. La surexpression de ce précurseur dans des racines transgéniques de *M. truncatula* affecte la genèse de leurs tissus vasculaires ainsi que celle des deux types d'organogenèse latérale. Dans un second temps, sont analysés les partenaires protéiques pouvant interagir avec le npcRNA *MtEnod40*, connu pour être impliqué dans l'organogenèse de la nodosité chez *M. truncatula*. Ces travaux ont abouti à l'identification d'une nouvelle famille de peptides, les gènes *MtSNARP* (for Small Nodulin Acidic RNA-binding Protein). Le peptide MtSNARP2 purifié s'est révélé capable de se lier aux ARN simple brin sans spécificité de séquence. Une approche fonctionnelle faisant intervenir l'extinction par « ARN interférent » du gène codant ce peptide de liaison à l'ARN, potentiellement sécrété, a mis en lumière un rôle dans la régulation de l'invasion des nodosités par *Rhizobium*. Aussi, l'interaction entre l'ARN *MtEnod40* et le peptide MtSNARP2 a été analysée *in vitro* et *in vivo* ; cependant des travaux additionnels sont requis pour démontrer la pertinence de cette interaction dans l'action de l'ARN *MtEnod40*. Fi. Signalons aussi la participation à un effort de recherche de nouveaux npcRNA chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Beaucoup de ces nouveaux gènes sont régulés au niveau des racines lors de stress abiotiques et la surexpression du npcRNA 536 induit la croissance des racines soumises à des conditions salines inhibitrices.

En définitive, ces résultats ont contribué à révéler de nouveaux rôles des npcRNA et de leurs partenaires protéiques dans le contrôle de l'architecture de la racine. Alors qu'aujourd'hui, partout dans le monde l'agriculture est confrontée aux problèmes de la salinisation des sols liée au recours massif à l'irrigation des cultures afin de pallier le manque d'eau, la connaissance des mécanismes permettant la régulation du développement des racines des plantes ouvre des perspectives au niveau agronomique : la compréhension des facteurs biologiques impliqués dans le développement des racines pourrait ainsi permettre d'optimiser la croissance des plantes de grande culture en milieux à

¹ Thèse de Doctorat es Sciences du Végétal, soutenue le 19 mai 2008 à l'université de Paris XI, 270 pages.

² Membre de l'Académie d'Agriculture de France, directeur de recherche honoraire du Centre national de la recherche scientifique, Institut des Sciences végétales, 91198 Gif-Sur-Yvette. Courriel : Francois.Blondon@isv.cnrs-gif.fr

salinité élevée.

En parallèle aux modifications de gestion des eaux agricoles, la connaissance de ces nouveaux ARN non-codants impliqués dans l'adaptation des racines au milieu environnant permettra éventuellement d'identifier puis de sélectionner des espèces ou des cultivars mieux adaptés à des milieux carencés ou trop anthropisés.

Dans le contexte actuel de nécessité de revoir les méthodes de cultures afin de pratiquer une agriculture plus durable ou plus adaptée aux milieux de culture difficiles des pays du Sud, l'accroissement des connaissances sur les facteurs moléculaires à l'origine des adaptations des plantes aux contraintes abiotiques semble crucial et ouvre des perspectives originales.

Résumé complet par l'auteur de la thèse extrait du CV

L'objectif général de ma thèse était de contribuer à la compréhension du rôle des ARN ne codant pas de protéine (non-protein coding ARN ou npcARN) dans la régulation de l'architecture de la racine.

- I. Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication d'un npcARN, le microARN 166 dans la régulation de l'architecture des racines chez la Légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Dans ce but, nous avons caractérisé un npcARN précurseur du miR166 et analysé l'effet de la surexpression de ce gène sur le développement du système racinaire et l'établissement de la symbiose entre *M. truncatula* et les bactéries du Genre *Rhizobium*.
- II. Parallèlement, nous avons continué l'étude du rôle de l'ARN *Enod40*, un long ARN non-codant impliqué dans le développement des nodosités symbiotiques chez les Légumineuses. Ce npcARN ne code apparemment pas pour un miRNA mais il agit en tant qu'ARN (Crespi *et al.*, 1994). Un peptide pouvant se lier à cet ARN *Enod40 a* été découvert, puis caractérisé en utilisant la technique de l'interférence ARN. Le rôle de ce nouveau peptide de liaison à l'ARN dans l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote chez les Légumineuses a ainsi pu être révélé (Laporte *et al.*, soumis). En parallèle, nous avons analysé son éventuelle interaction *in vivo* avec l'ARN *Enod40* et MtRBP1, une protéine relocalisée par l'action de cet ARN.
- III. Enfin, dans le but de déterminer un rôle plus général aux ARN non-codant et aux protéines de liaison à l'ARN dans le développement et l'architecture de la racine, j'ai, d'une part, contribué à la recherche de longs ARN non-codants chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Ben Amor *et al.*, 2008) et, d'autre part, j'ai recherché des homologues des partenaires protéiques de l'ARN *Enod40* chez *Arabidopsis*. La protéine de liaison à l'ARN MtRBP1 (Campalans *et al.*, 2004) s'est révélé être homologue à deux protéines d'*Arabidopsis thaliana* (AtMRLa et b JMtRBP1-Like a et b]). Nous avons surexprimé le gène *AtMRLa*, mais également identifié des lignées mutantes de ces deux gènes, afin de relier ces gènes à une fonction générale du développement des plantes qu'elles établissent ou non une interaction symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote.

Les plantes ont la capacité de faire varier l'architecture de leurs racines afin de s'adapter au mieux aux conditions environnementales au niveau du sol. Ainsi les contraintes abiotiques aussi bien que biotiques sont à l'origine de modulations de la croissance des racines primaires et de l'organogenèse des racines latérales. Les Légumineuses possèdent en outre la particularité de développer deux types d'organes latéraux, les racines latérales et les nodosités symbiotiques. Ces dernières sont caractérisées par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via une interaction mutualiste avec les bactéries du Genre *Rhizobium*. Ces dernières années, de nombreux ARN ne

codant pas de protéines (npcRNA) sont apparus comme étant de nouveaux régulateurs du développement et de la réponse aux stress. Ces ARN, dit riborégulateurs, incluent une large diversité de petits ARN (mi/tasiRNA), ainsi que d'autres classes d'ARN dont les mécanismes d'action restent largement inexplorés. Lors de ce travail de Thèse, nous avons exploré le rôle et les mécanismes d'action de certains npcRNA concernant l'architecture de la racine chez *Medicago truncatula*.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'action d'un micro ARN (MIR166) dans la régulation du développement de la racine et des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*. Ce MIR présente la particularité d'être transcrit sous la forme d'un tandem porté par un npcRNA précurseur unique *MtMIR166a*, un fait rare chez les plantes. Pour ma part, j'ai commencé par la caractérisation de racines transgéniques surexprimant le précurseur du tandem MIR166 afin de rechercher une implication de ce micro ARN (miRNA) dans l'organogenèse latérale chez *M. truncatula*. Tout d'abord en étudiant l'établissement de la symbiose lors de l'interaction avec les bactéries symbiotiques *Sinorhizobium meliloti*. Par la suite, afin de déterminer les conséquences de cette surexpression sur la rhizogenèse latérale, nous avons utilisé un milieu induisant le développement de racines latérales. Une diminution significative du nombre de racines latérales formées sur les racines transgéniques surexprimant le précurseur *MtMIR166a* m'a conduit à rechercher les causes de cette diminution du développement des organes latéraux de la racine au niveau tissulaire. L'étude histologique de la racine a permis de mettre en évidence une mise en place anarchique des tissus conducteurs, avec un accroissement du nombre de faisceaux du Xylème et une absence d'organisation des vaisseaux du phloème au sein de la stèle. Ces résultats suggèrent l'implication de régulations arbitrées par le MIR166, affectant la stabilité de nombreux transcrits de la Famille des *HD-ZIP III*, dans le développement des faisceaux vasculaires et l'architecture de la racine des Légumineuses (Boualem, Laporte *et al.*, 2008).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au mode d'action d'un ARN noncodant pour **des protéines, l'ARN MtENOD40. Tout d'abord, en employant une approche triple-hybride (SenGupta *et al.*, 1996) le laboratoire avait découvert deux peptides appartenant à une famille de huit gènes très conservés, ainsi qu'une protéine de liaison à l'ARN (MtRBP1 ; Campalans *et al.*, 2004), qui pouvaient interagir avec l'ARN MtENOD40. ENOD40 est un gène qui s'exprime spécifiquement lors de la formation des nodosités symbiotiques, dont l'ARN a été associé à une activité de « chaperon » moléculaire qui permet la relocalisation de la protéine nucléaire MtRBP1 vers le cytoplasme. Aussi, il est apparu intéressant de connaître l'implication de ces peptides dans un tel rôle. Ces peptides possèdent un signal de sécrétion suggérant qu'ils pourraient également participer à des communications de cellule à cellule. J'ai donc analysé l'action d'un de ces peptides, MtSNARP2 (Small Nodulin Acidic RNA-binding Protein 2), dans l'établissement de la symbiose entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Afin de bien caractériser les propriétés de liaison aux ARN de ces peptides, nous avons mis en place une collaboration avec Biomedal S.L. à Séville en Espagne et avec le laboratoire de Jozsef Burgyan à Szeged en Hongrie. J'ai également utilisé une approche d'extinction du gène *MtSNARP2* par ARN interférents (ARNi) pour étudier le rôle de ce peptide sur la mise en place de l'interaction symbiotique entre *M. truncatula* et *S. meliloti*. Finalement la caractérisation de l'expression spatio-temporelle de ce peptide MtSNARP2 a été réalisée par Hybridaton *in situ*, et la mise en place de l'interaction symbiotique dans des racines transgéniques exprimant une construction *MtSNARP2* ARNi par microscopie optique et électronique. Ainsi, ces travaux ont abouti à l'identification d'une nouvelle famille de peptides, les gènes *MtSNARP* (for Small Nodulin Acidic RNA-binding Erotein). Le peptide MtSNARP2 purifié s'est révélé capable de se lier aux ARN simple brin sans spécificité de séquence. L'approche fonctionnelle faisant intervenir l'extinction par « ARN interférent » du gène codant ce peptide de liaison à l'ARN, potentiellement sécrété, a mis en lumière un rôle dans la régulation de l'invasion des nodosités par *Rhizobium* (Laporte *et al.*, soumis). De plus, l'interaction entre l'ARN *MtEnod40* et le peptide**

MtSNARP2 a été analysée *in vitro* et *in vivo* via l'utilisation de fusions fluorescentes et du système ARN::MS2/MS2::GFP (permettant de suivre la localisation d'ARN *in vivo*); cependant des travaux additionnels sont requis pour démontrer la pertinence de cette interaction dans l'action de l'ARN *MtEnod40*.

Enfin, nous avons élargi notre recherche à l'analyse du rôle des npcARN dans la différenciation et la réponse au stress chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ce modèle présente de nombreux avantages (mutants, génome complet, annotation exhaustive, transcriptome, etc..) permettant une analyse « genome-wide » de l'action des npcARN. D'abord nous avons cherché à identifier de nouveaux npcARN chez cette plante. Cet effort a été mené dans le laboratoire par plusieurs postdocs dans le cadre d'un projet EEC (projet RIBOREG du FP6) et j'ai contribué à cette recherche par l'analyse de l'expression de certains de ces gènes lors de stress abiotiques et la préparation de certaines des plantes transgéniques sur-exprimant des npcARN. En effet, la surexpression d'un de ces npcARN nouvellement caractérisés, le npcARN 536, a révélé une induction de la croissance de ses racines lorsqu'elles sont soumises à des conditions salines inhibitrices (Ben Amor *et al.*, 2008). Ensuite, je me suis intéressé particulièrement à une éventuelle conservation du mécanisme identifié chez *Medicago truncatula* impliquant MtRBP1 et le npcARN ENOD40. Comme il n'y avait pas d'homologue à ce npcARN chez *Arabidopsis* (bien que récemment des régions structurales similaires ont été identifiées ; Gulyaev and Roussis, 2007), je me suis intéressé à la caractérisation des protéines de liaison à l'ARN, homologues de MtRBP1 chez *A. thaliana*, AtMRLa et AtMRLb (MtRBP1 Like). Comme déjà mentionné, chez *Medicago spp.*, MtRBP1 est relocalisée du noyau vers le cytoplasme par l'action du npcRNA *ENOD40*. Il paraissait intéressant de savoir si un tel mécanisme est conservé et ainsi trouver de nouveaux ARN pouvant avoir un rôle de chaperon moléculaire.

En définitive, ces résultats ont contribué à révéler de nouveaux rôles des npcRNA et de leurs partenaires protéiques dans le contrôle de l'architecture de la racine.

Références citées

- (1) Ben Amor* B., Wirth* S., MERCHAN F., LAPORTE P., D'AUBENTON-CARAFAY., HIRSCH J., MAIZEL A., MALLORY A., LUCAS A., DERAGON J.M., VAUCHERET H., THERMES C. and CRESPI M., 2008. – Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Research*, doi:10.1101/gr.080275.108
- (2) BOUALEM A.*, LAPORTE P.*, JOVANOVIC M., LAFFONT C., PLET J., COMBIER J.P., NIEBEL A., CRESPI M. and FRUGIER F., 2008. – MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J* **54**, 876-887.
- (3) CAMPALANS A., KONDOROSI A., and CRESPI M. 2004. – Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **16**,1047-1059.
- (4) CRESPI M.D., JURKEVITCH E., POIRET M., D'AUBENTON-CARAFAY., PETROVICS G., KONDOROSI E. and Kondorosi A., 1994. – enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *Embo J* **13**, 5099-5112.
- (5) GULTYAEV A.P. and ROUSSIS A. 2007. – Identification of conserved secondary structures and expansion segments in enod40 RNAs reveals new enod40 homologues in plants. *Nucleic Acids Res* **35**, 3144-3152.
- (6) Laporte P., Satiat-Jeunemaître B., Velasco I., Csorba T., Van de Velde W., Campalans A., Burgyan J., Arevalo Rodriguez M. and Crespi M.. – A novel RNA-binding peptide regulates

rhizobial invasion in the *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium meliloti* symbiosis (2008) soumis à *The Plant Journal*.

- (7) SenGupta D.J., Zhang B., Kraemer B., Pochart P., Fields S., and Wickens M., 1996. – A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8496-8501.

Quelques mots sur la valorisation pour des applications

Lors de ce travail de Thèse, des mécanismes moléculaires fins faisant intervenir des ARN non-codants ont été mis en lumière. En effet, des ARN non-codants se sont révélés être des régulateurs de l'architecture de l'appareil racinaire, particulièrement lors de stress salins.