



Validation fonctionnelle chez les pucerons

Véronique Brault



La validation fonctionnelle chez le puceron

Pour faire quoi?

Valider la fonction d'un gène en inhibant son expression ou en le sur-exprimant

Lier un effet phénotypique à une fonction d'un gène

Comment faire?

Inhibition:

Via les mécanismes d'ARN interférence: Véro

retours d'expériences: Federica, Sylvaine et Guy

Via la modification du génome: Gaël

Sur-expression:

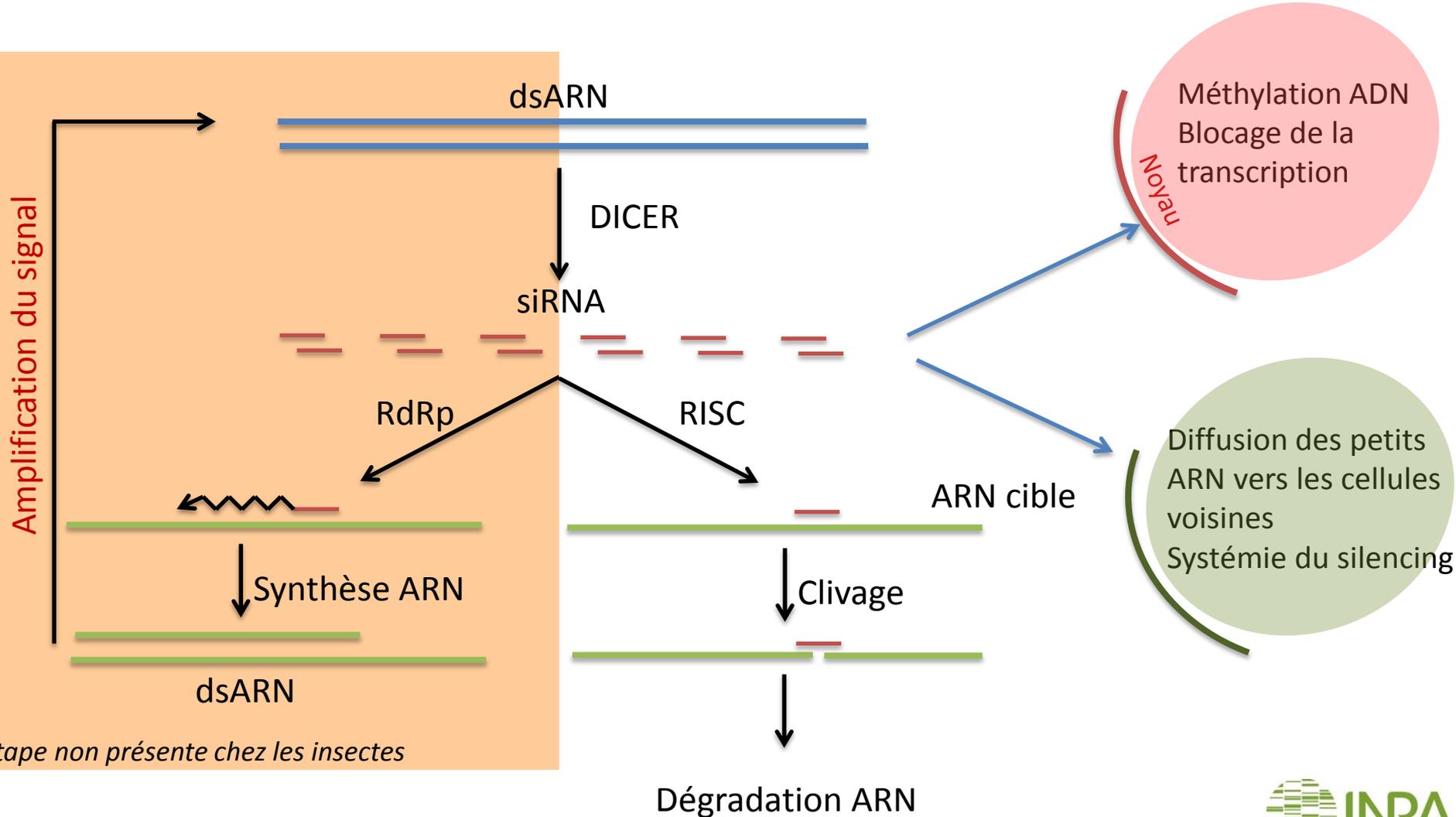
Via vecteur viral d'expression: Véro

retour d'expérience: Gabriel

Validation fonctionnelle chez les pucerons par les techniques basées sur l'ARN interférence

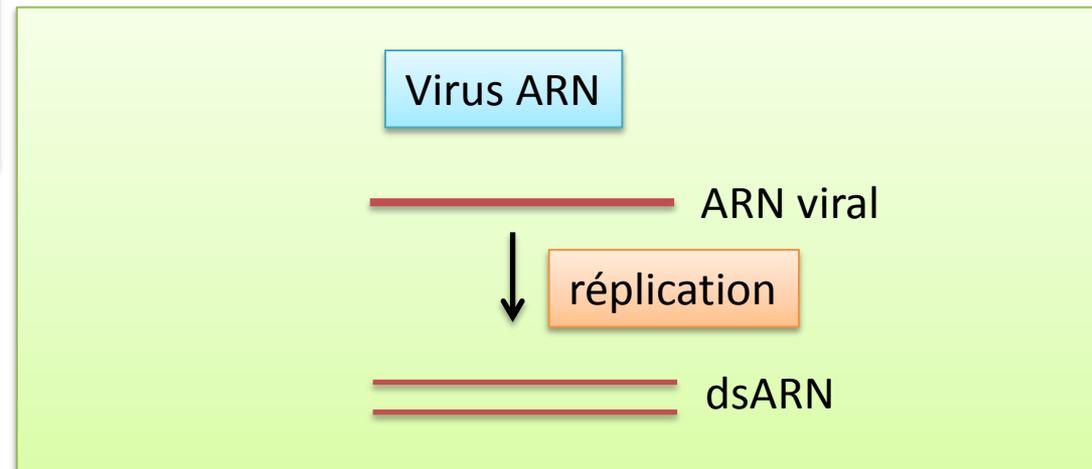
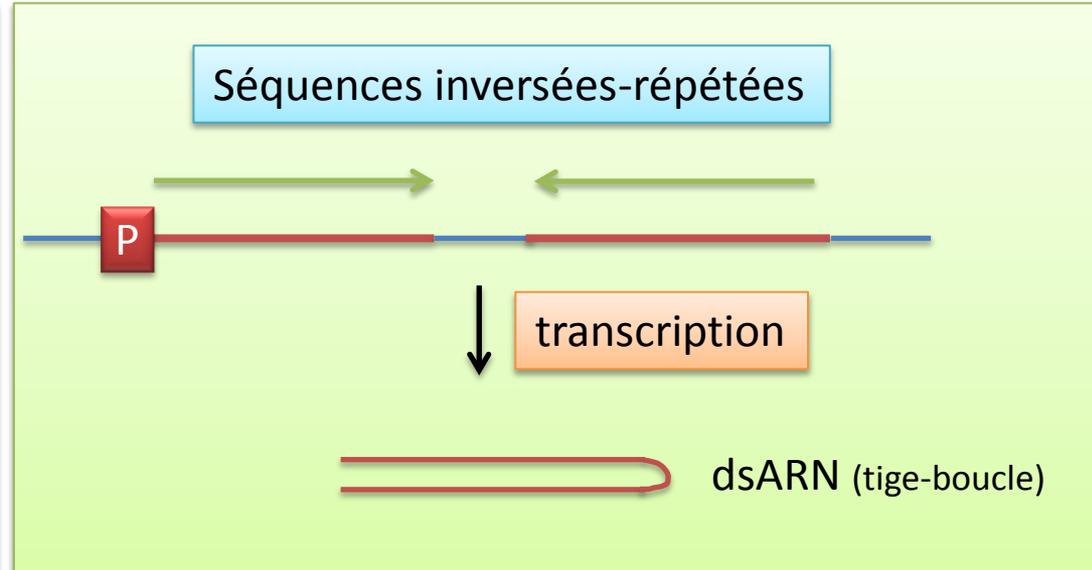
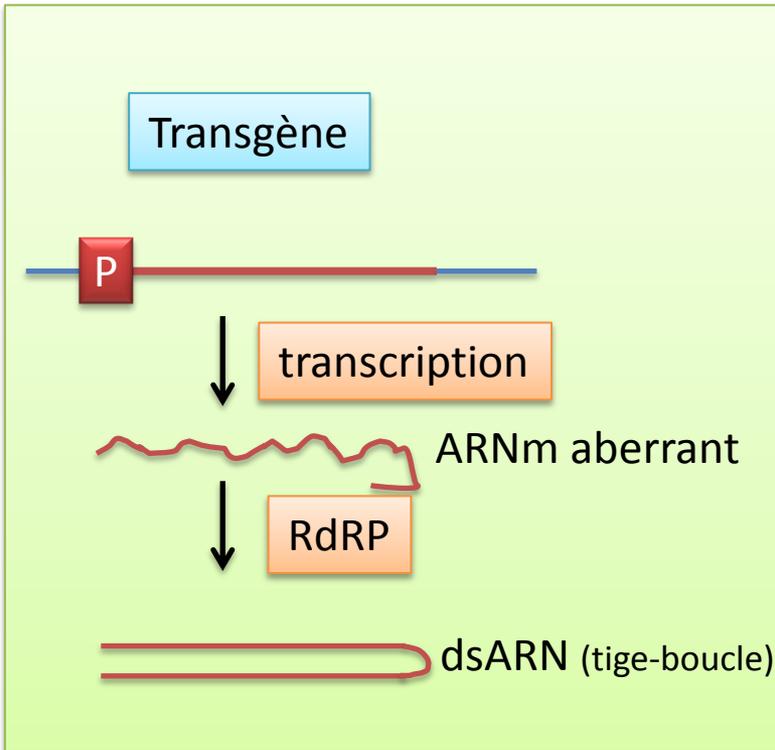
L'ARN interférence

Mécanisme qui va conduire à l'inhibition de l'expression d'un gène via des petits ARNs non codant (siRNA) qui vont entraîner le clivage de l'ARN messager du gène ou bloquer sa traduction

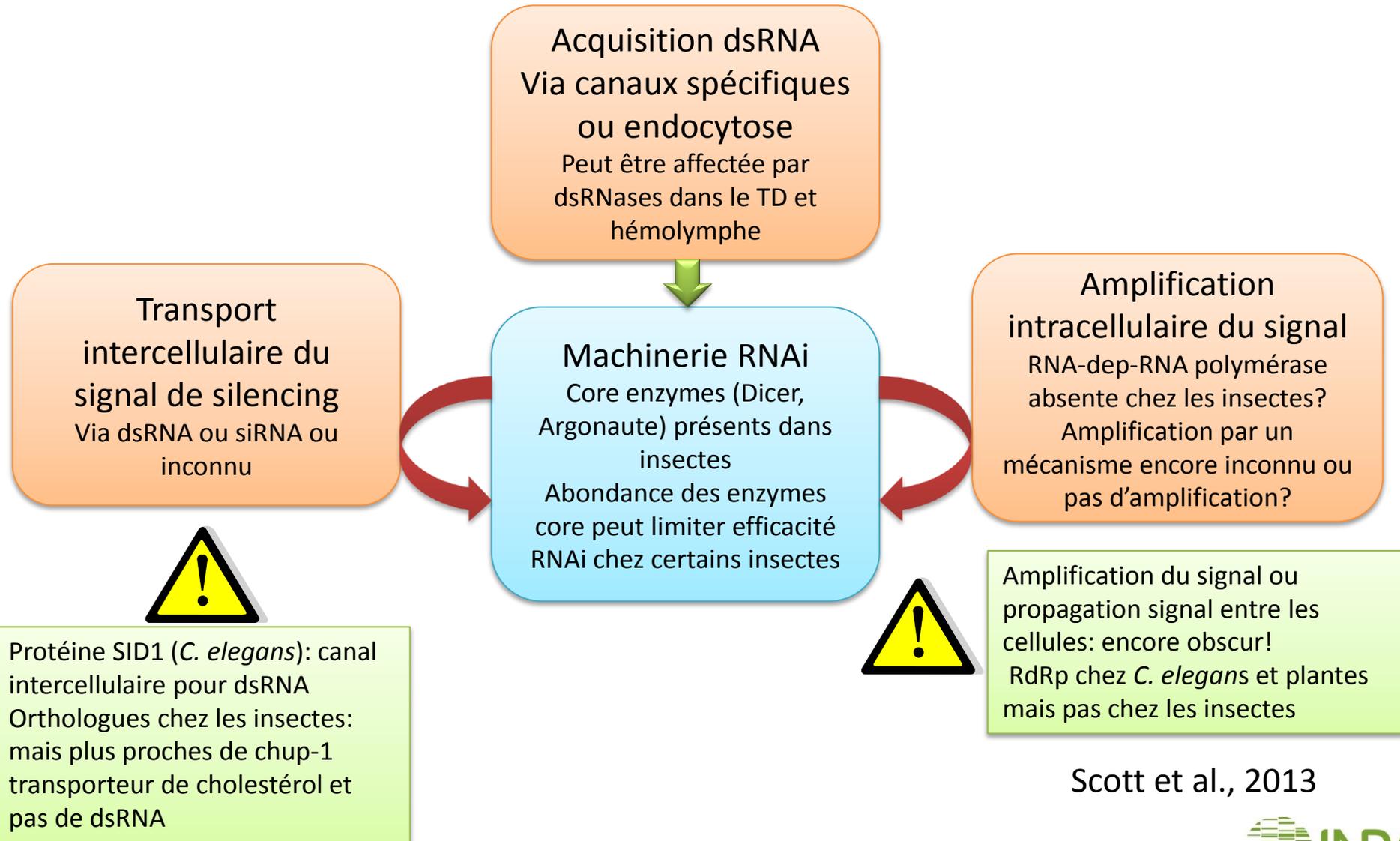


L'ARN interférence

Origine des dsARN



Les étapes qui peuvent moduler l'efficacité du mécanisme RNAi



Scott et al., 2013

Efficacité variable de cette technique

varie selon: Les espèces d'insectes
Le mode d'acquisition des dsRNA
Le gène cible
Les laboratoires!!

diminution transitoire de l'expression du gène (qq jours)

Efficacité n'excède **rarement 60%**!

A l'heure actuelle: aucune capacité à concevoir la stratégie
« idéale » pour obtenir l'extinction d'un gène donné



Design d'une expérience d'ARN interférence

Nécessité d'inclure un **contrôle négatif** qui ne cible aucun gène de l'insecte (GFP, LacZ,...)

Eventuellement **contrôle positif**: effet phénotypique fort (pas vraiment disponible pour pucerons)

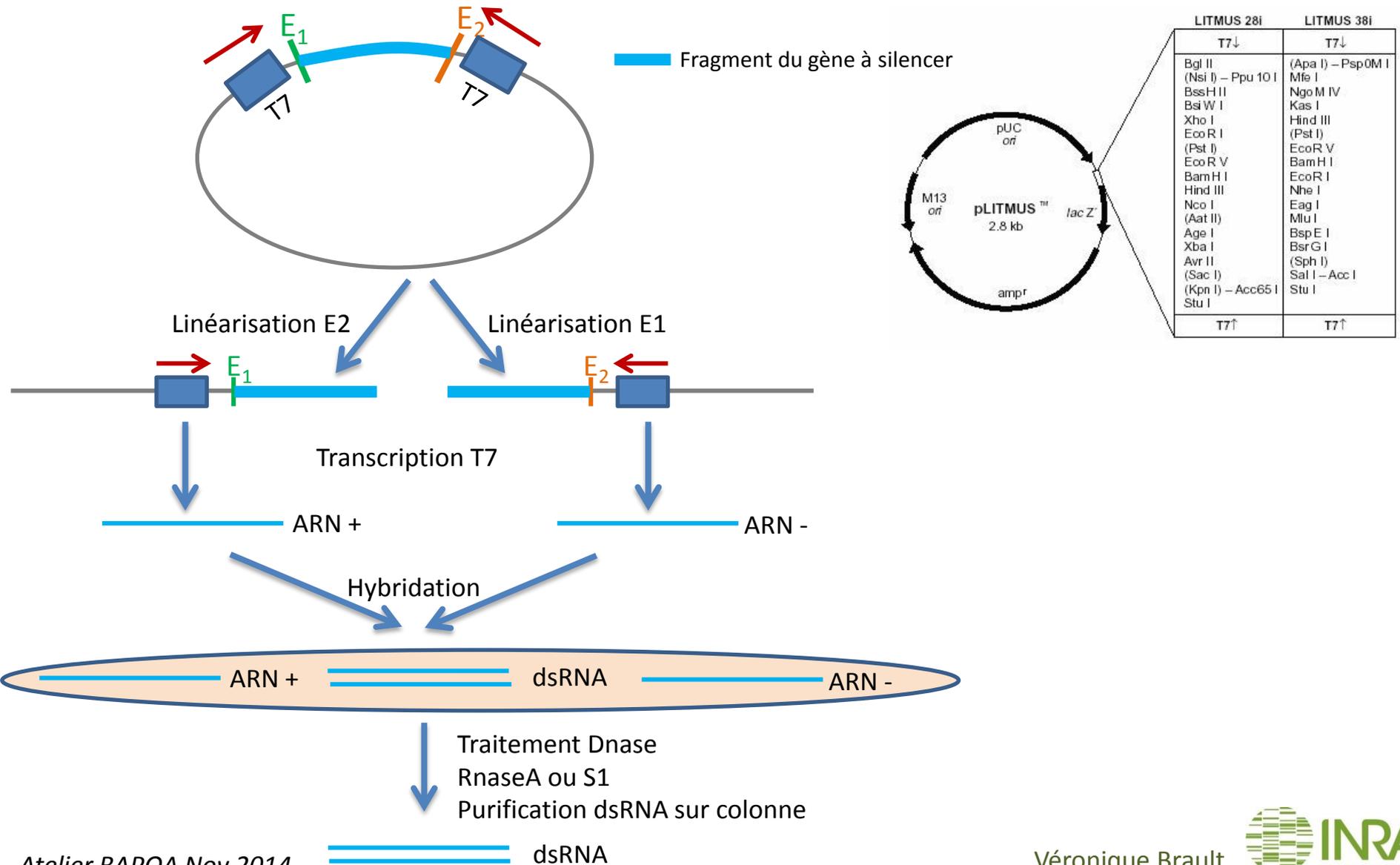
Choix de la séquence: **longueur et spécificité**

- de 134 pb à 1842 pb mais plus commun entre 300 et 500 pb
- toujours plus de 250 pb: permet la production d'une population de siRNA donc augmente l'efficacité du silencing
- Longueur dépend de la nature du gène: famille multigénique avec forte similarité de séquence, soit cibler les régions identiques (extinction de plusieurs gènes), soit les séquences qui sont uniques (extinction d'un seul gène)
- Séquence non-codante généralement plus efficace (3' plutôt que 5')
- spécificité: un non-appariement peut affecter le RNAi mais certains non-appariements font basculer la dégradation de l'ARNm vers son absence de traduction (miRNA)

Variabilité dans l'efficacité des séquences donc nécessité de tester plusieurs séquences, si possible. **Programme E-RNAi** (*A. pisum*) permet de choisir une région qui n'a pas d'autres séquences homologues sur le génome et région peu structurée

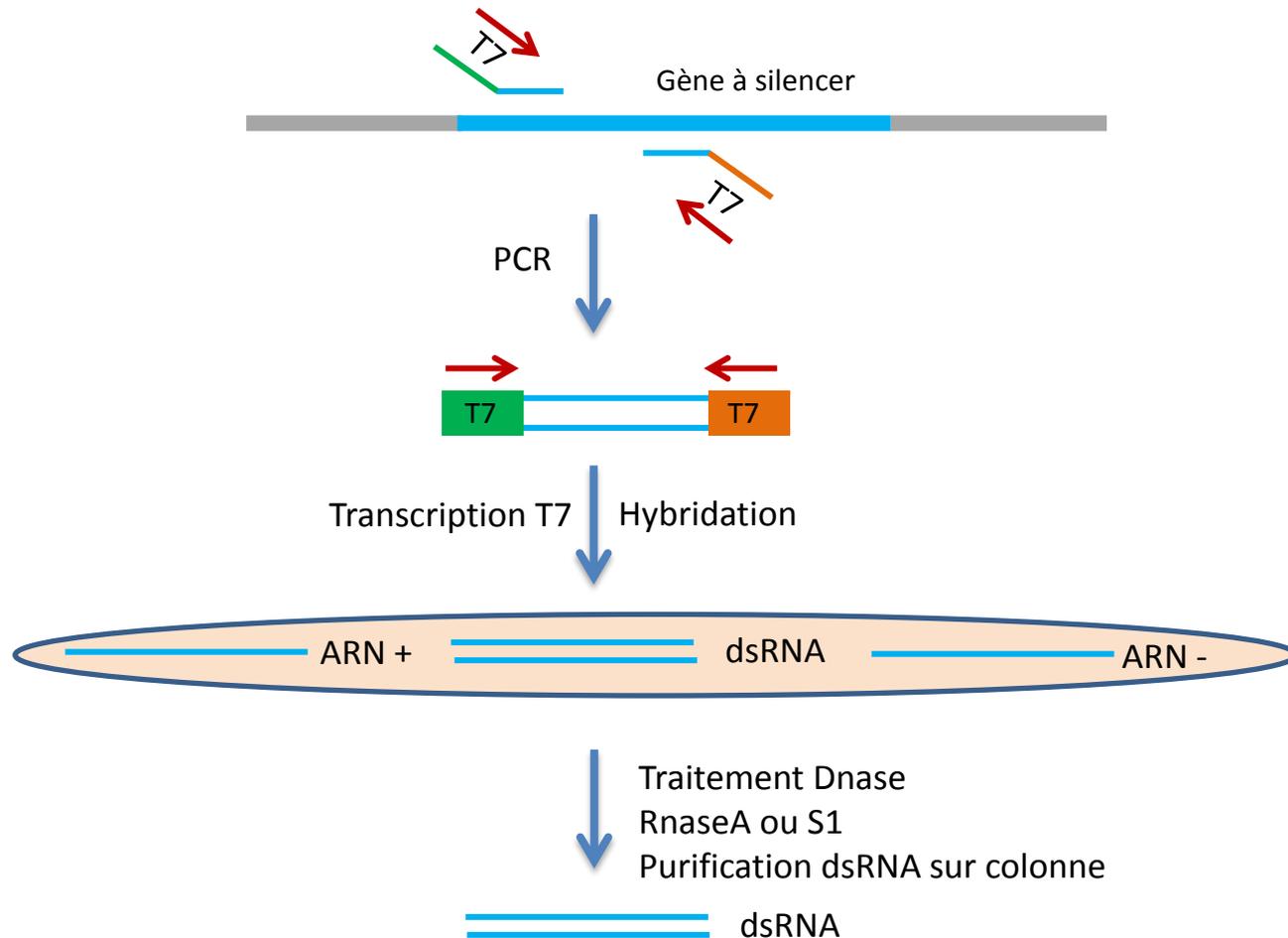
Production de la molécule dsRNA *in vitro*

dsRNA obtenus par transcription à partir d'un plasmide



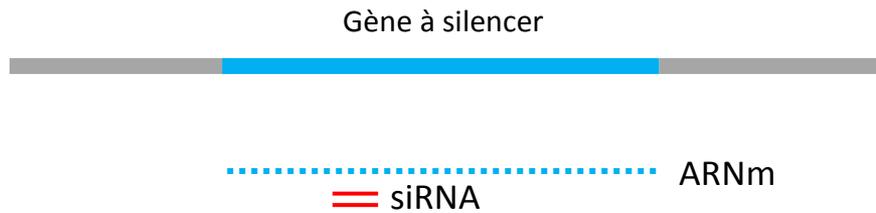
Production de la molécule dsRNA *in vitro*

dsRNA obtenus par transcription à partir d'un fragment PCR

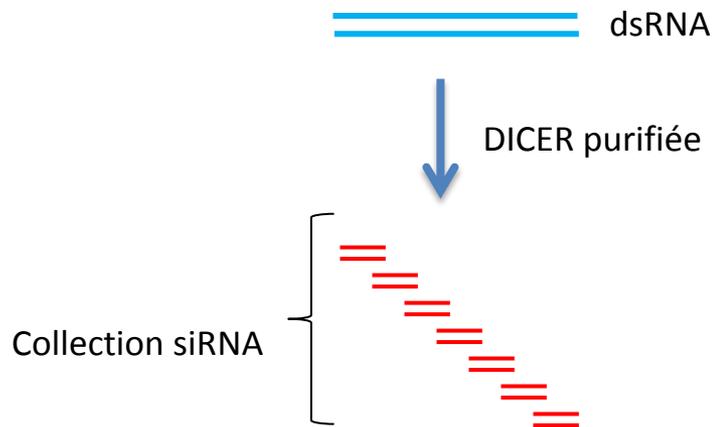


Production de la molécule siRNA *in vitro*

- **Synthèse chimique:** coûteuse et ne cible qu'une région du gène

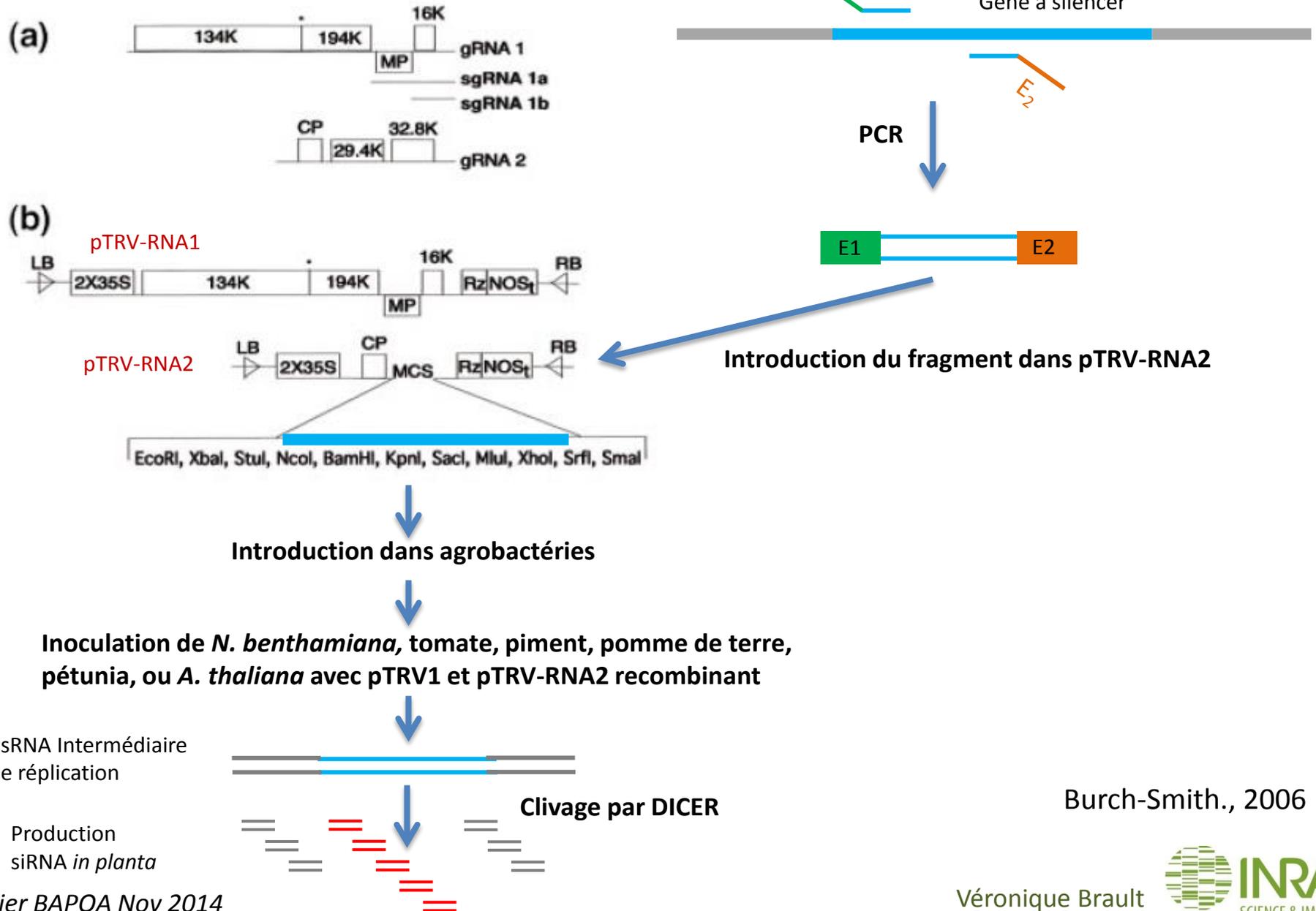


- Possibilité d'utiliser des siRNA produits *in vitro* par DICER sur dsRNA obtenus par transcription *in vitro*



Production de la molécule dsRNA à partir d'un vecteur viral *in planta*

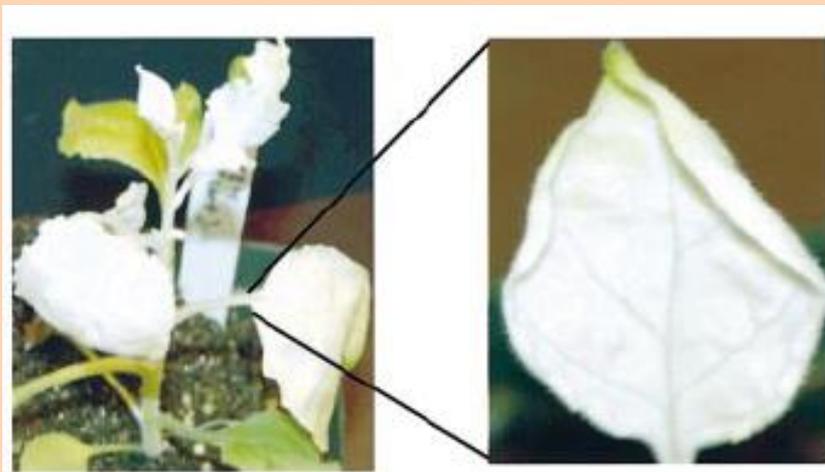
Tobacco rattle virus (TRV)



Burch-Smith., 2006

Production de la molécule dsRNA à partir d'un vecteur viral *in planta*

Silencing de la phytoène désaturase chez *N. benthamiana*

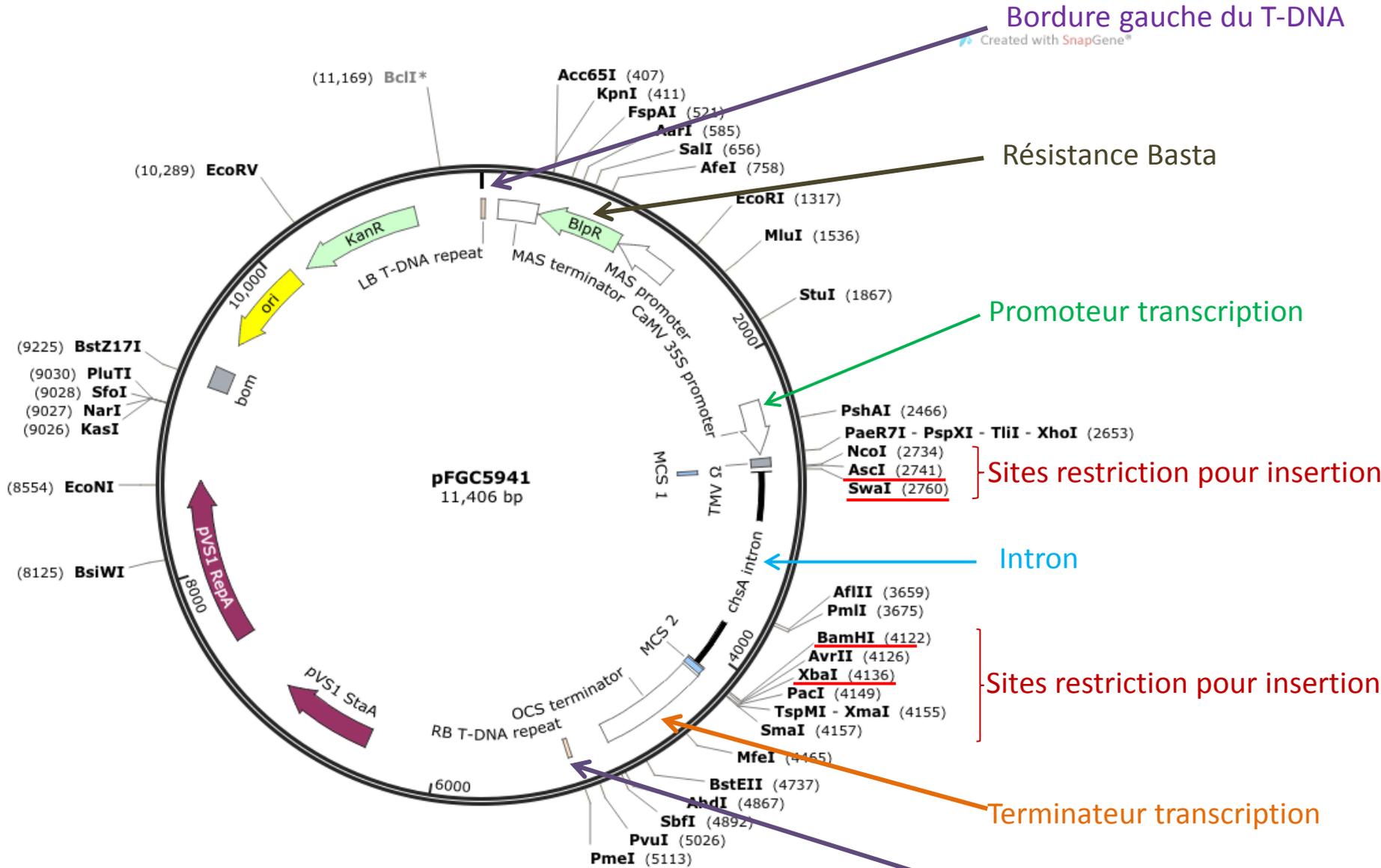


Liu et al., Plant J 2002 30: 415-429



- Difficulté de suivre la répartition du virus dans la plante
- Silencing pas forcément homogène

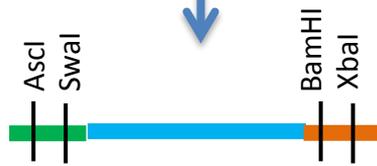
Production de la molécule « hairpin » *in planta*



Production de la molécule « hairpin » *in planta*



PCR



Digestion Swal/BamHI

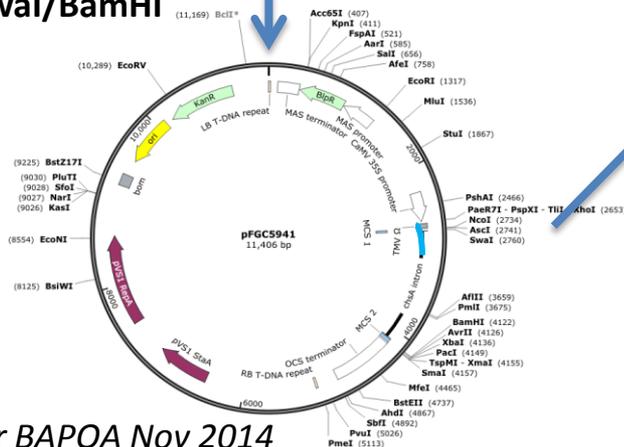


Digestion Ascl/XbaI

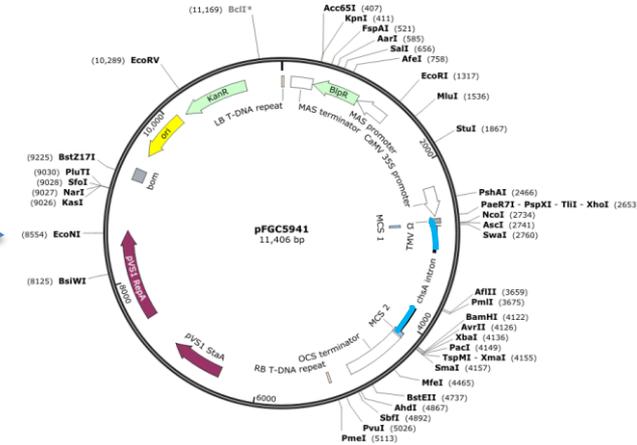


Clonage dans pFGC

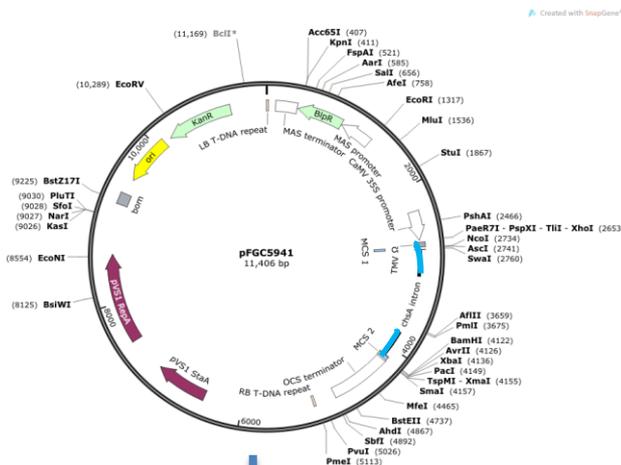
Swal/BamHI



Clonage dans pFGC
Ascl/XbaI



Production de la molécule « hairpin » *in planta*



Introduction dans
Agrobacterium tumefaciens

Expression transitoire par
infiltration
(*Nicotiana benthamiana*)

Transformation stable
(*Arabidopsis thaliana*)

Transcription

Formation
« hairpin »

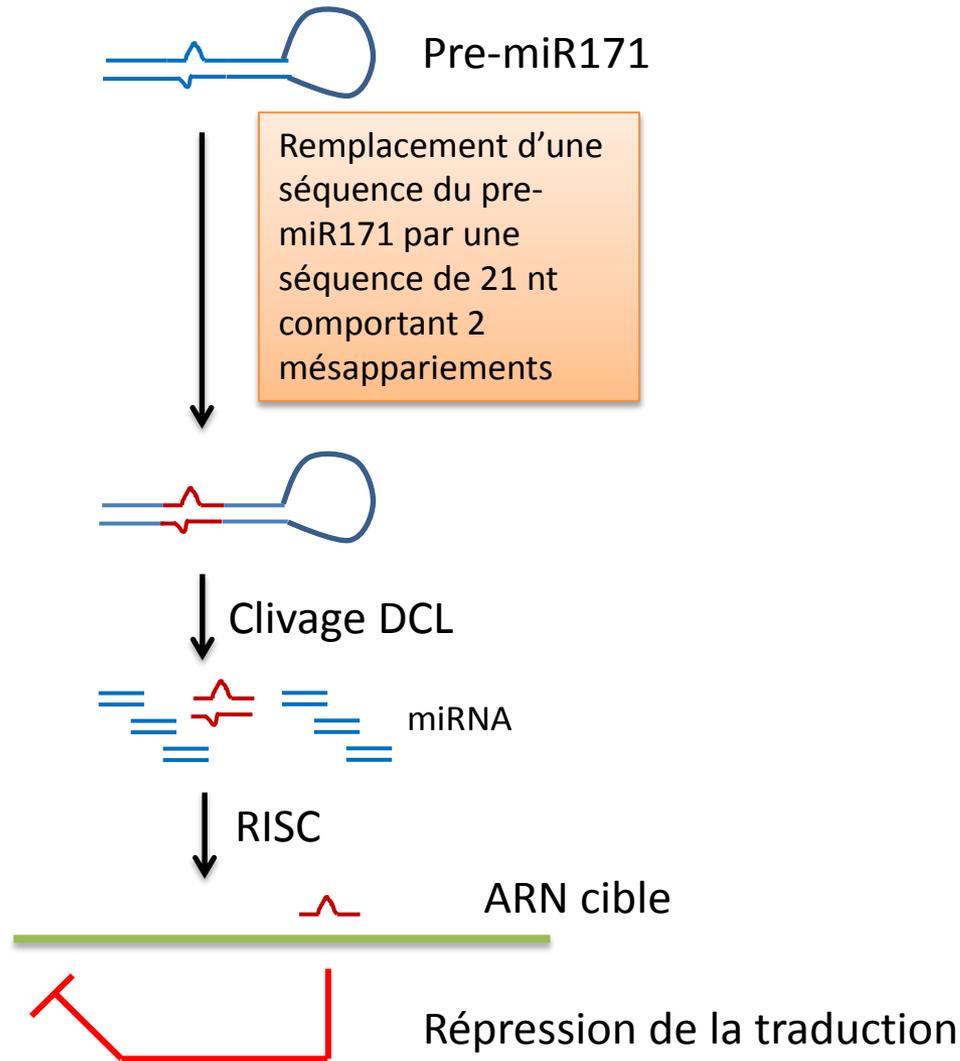


Clivage par DICER

Production
siRNA *in planta*

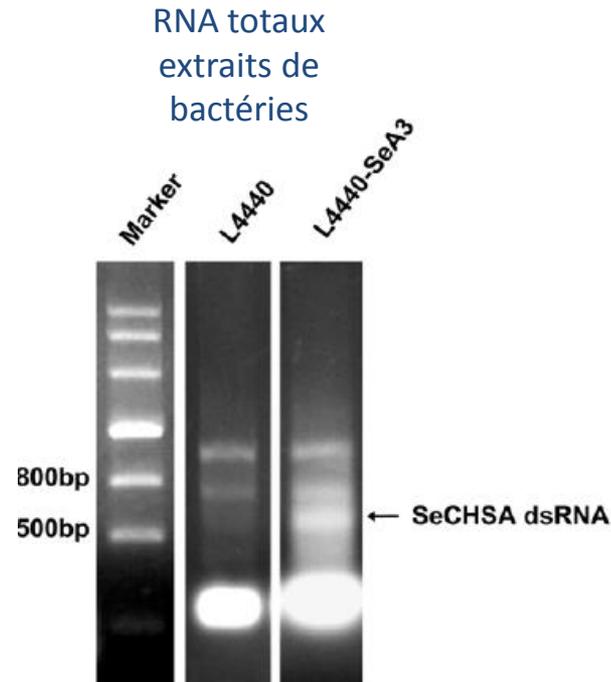
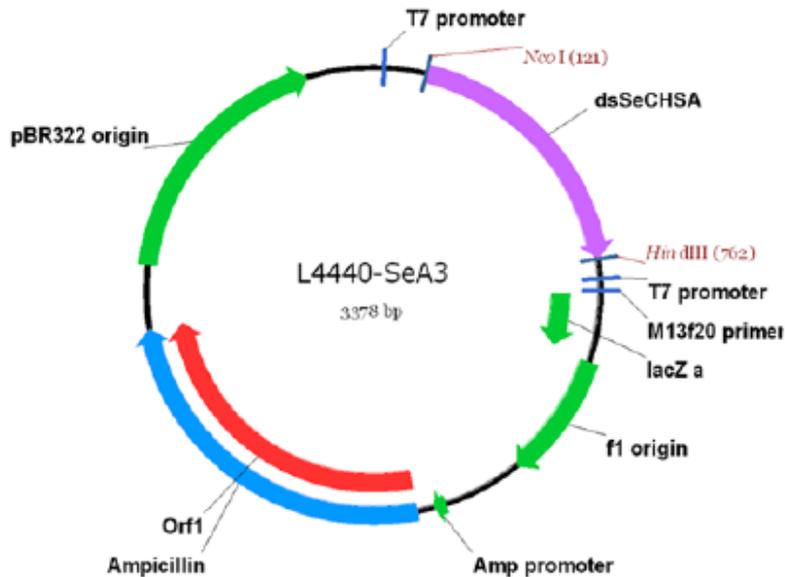


Production de la molécule amiRNA *in planta*



Production de la molécule dsRNA dans des bactéries

- Technique peu coûteuse
- Introduction du plasmide L4440 dans une souche de bactérie mutée dans le gène RNaseIII
- Ingestion des bactéries produisant les dsRNA
- Testé chez les lépidoptères: *Chitin synthase gene*
- Est-ce possible pour les pucerons?



Tian et al., 2009

Design d'une expérience d'ARN interférence

Méthodes d'acquisition

À partir de dsRNA ou siRNA synthétisés *in vitro*

- **Injection dans l'hémolymphe:** problème des dégâts collatéraux causés par l'injection
Facteurs qui influencent la survie: méthodes d'immobilisation (froid, CO2, adhésion à un substrat), volume injecté et le diluant

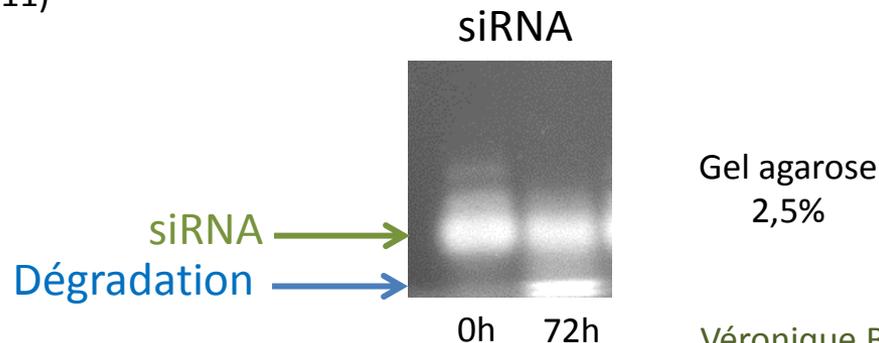
Méthode plus adaptée pour cibler des gènes localisés dans la tête (glandes salivaires) ou des organes directement accessibles à partir de l'hémolymphe

- **Acquisition orale:** méthode moins destructive

Mélange des dsARN dans le milieu nutritionnel des insectes

Cible préférentiellement gènes intestinaux mais possibilité de toucher des gènes salivaires (MpC002, Pitino et al., 2011)

Stabilité des siRNA après 72h



Gel agarose
2,5%

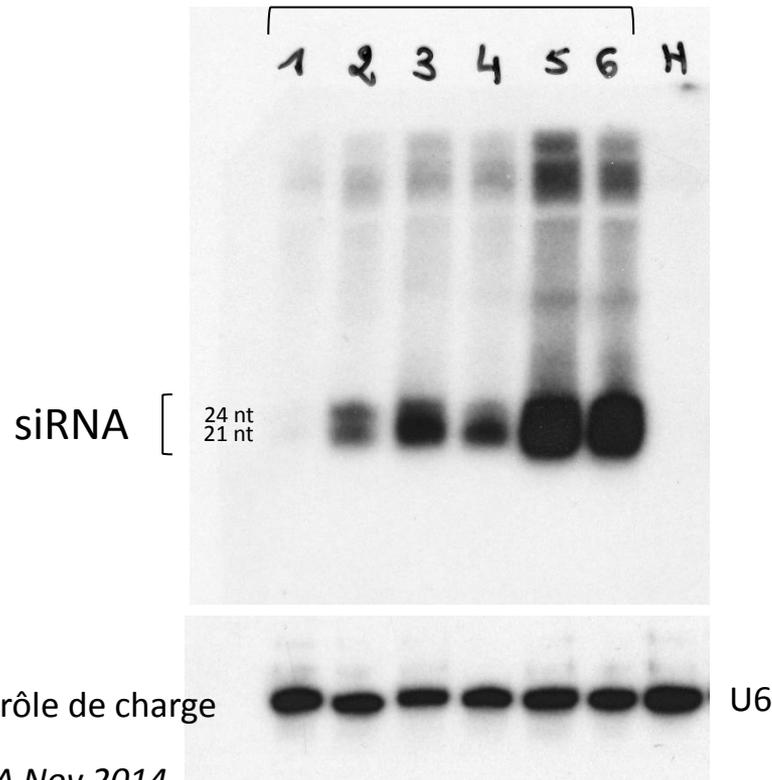
Véronique Brault

Méthodes d'acquisition

À partir de dsRNA ou siRNA synthétisés *in planta*

Production transitoire des dsRNA: dans *N. benthamiana*

- expression dans cellules de l'épiderme et du mésophylle
- est-ce suffisant pour une acquisition efficace? Prélèvement des siRNA au moment des piqûres d'épreuve
- nécessite d'avoir une espèce de puceron adaptée à *N. benthamiana*



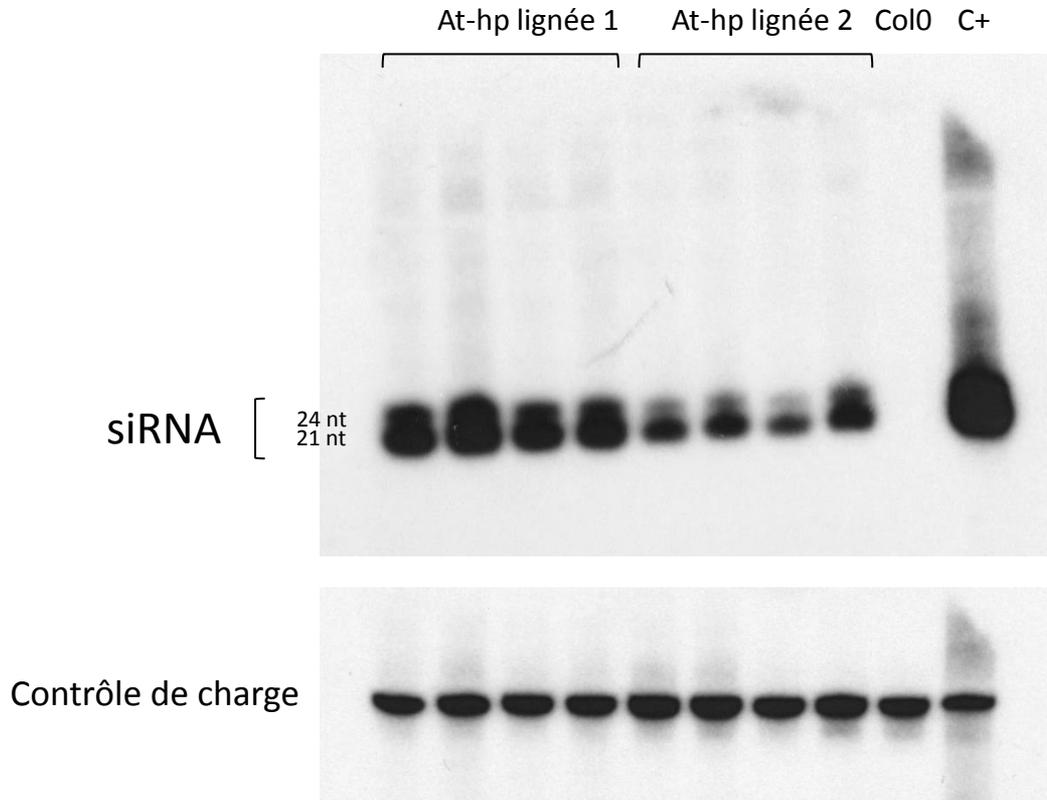
Expression maximale 5 à 6 jours post-agroinoculation

Acquisition des siRNA sur des disques foliaires mais renouvellement des disques tous les 5 jours

Méthodes d'acquisition

À partir de dsRNA ou siRNA synthétisés *in planta*

Production constitutive des dsRNA: dans *A. thaliana*



Moins de siRNA produits/N. bentha mais peut-être plus accessibles?

Possibilité d'allonger les temps d'acquisition (60% silencing après 4 jours et 70% après 8 jours d'acquisition dsRNA)

Persistance du silencing 6 jours sans source dsRNA

Transfert du silencing de la mère aux embryons + persistance silencing plus longue

Perte de la production des siRNA au fil des autofécondations?

A vérifier

Coleman et al., 2014

Design d'une expérience d'ARN interférence

Quelle quantité de molécules RNAi?

La quantité des molécules RNAi à faire acquérir dépend:

- de l'espèce d'insecte
- du stade de développement
- du niveau d'expression du gène (expression importante, silencing plus difficile)
- de sa distribution spatiale et temporelle
- de la méthode d'acquisition (quantité plus importante pour acquisition orale que microinjection)

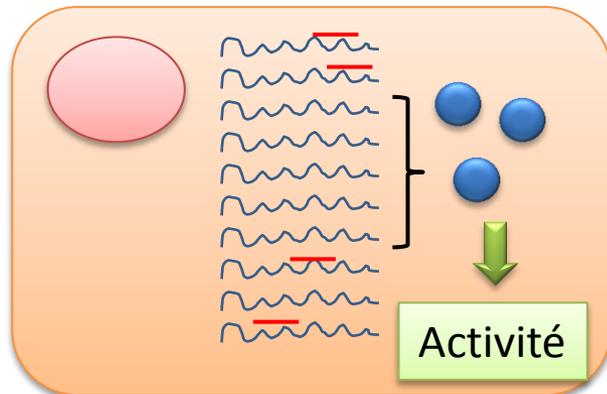
- Notes
- Viscosité des dsRNA limite la concentration à 6 µg/µl
- Coût de la synthèse de grandes quantités de dsRNA et des siRNA
- Introductions multiples peuvent favoriser l'efficacité (stimulation de la machinerie RNAi?)

Design d'une expérience d'ARN interférence

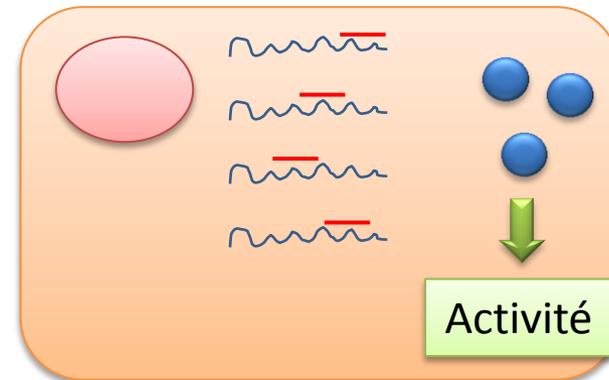
Choix du gène

Le gène idéal?

- Expression faible
- Faible demi-vie de la protéine (RNAi inefficace pour protéines très stables)



Gène fortement exprimé: tous les ARNm ne peuvent être ciblés



Protéine stable: les ARNm sont dégradés mais la protéine est maintenue dans la cellule

Evaluation de l'efficacité du silencing

Effets phénotypiques: variables selon la fonction du gène analysé

Mortalité: moyen efficace pour tester l'efficacité du silencing mais un problème pour analyser la fonction d'un gène

Fécondité: moyen souvent utilisé pour voir la diminution d'expression d'un gène

Notes

- Effet délétère du silencing pas forcément souhaité car peut entraîner des effets pléiotropiques sur la fitness de l'insecte (rechercher plutôt un knockdown plutôt que knockout)
- Effet phénotypique pas toujours observable en raison de la redondance fonctionnelle des protéines

Analyse moléculaire: par Q-RT-PCR

- Choix des gènes de référence délicat : opter pour au moins deux gènes plutôt qu'un. L'expression d'un gène de référence peut varier selon la physiologie et le tissu cible
- Faire aussi une cinétique: augmentation de l'expression du gène observée dans plusieurs expériences après un temps assez court (24h)
- Attention au choix des oligos pour la Q-RT-PCR: choisir en dehors de la zone utilisée pour l'expression des dsRNA

Exemples d'utilisation de la technique d'ARN interférence chez le puceron

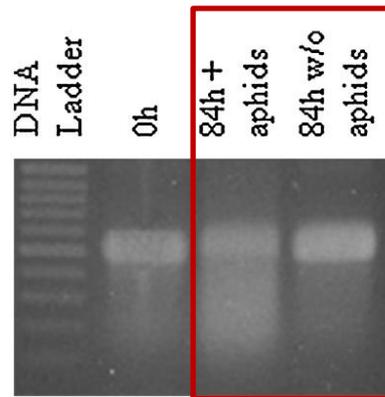
Study	Aphid species	Administration mode	Targeted transcripts	Tissue expression	RNAi efficiency % expression reduction	Phenotype
Mutti et al., 2006	A. pisum	siRNAs injection	C002 (effector)	Salivary glands	40%	Lethal
Jaubert et al., 2007	A. pisum	dsRNAs injection	Cathepsin-L Calreticulin	Gut Whole body	40% 40%	No phenotype No phenotype
Mutti et al., 2008	A. pisum	siRNAs injection	C002 (effector)	Salivary glands	40%	Reduced performance
Christiaens et al., 2014	A. pisum	dsRNA injection	C002 (effector)	Salivary glands	0%	No phenotype
Whyard et al., 2009	A. pisum	Feeding on artificial media with dsRNAs	vATPase	Gut	31%	Lethal
Christiaens et al., 2014	A. pisum	Feeding on artificial media with dsRNAs	vATPase	Gut	0%	No phenotype
Shakesby et al., 2009	A. pisum	Feeding on artificial media with dsRNAs	Aquaporin 1	Gut	50%	Elevated osmotic pressure
Pitino et al., 2011	M. persicae	dsRNA Constitutive expression in Arabidopsis thaliana or transient expression in Nicotiana benthamiana	Rack1 C002 (effector)	Gut Salivary glands	30-40% N. benthamiana 50%-60% A. thaliana	Reduced aphid fecundity Reduced aphid fecundity
Pitino & Hogenhout, 2013	M. persicae	dsRNA transient expression in N. benthamiana, constitutive expression in A. thaliana	PlntO1, PlntO2 (effectors)	Salivary glands	20-30% N. benthamiana 40% A. thaliana	Reduced aphid fecundity for PlntO2 and not O1
Bathia et al., 2012	M. persicae	dsRNA constitutive expression in A. thaliana	Serine protease	Gut	30 to 60%	Reduced gut protease activity and altered fecundity
Mao & Zeng, 2012	A. pisum	Feeding on artificial media with dsRNAs	Hunchback	Embryo	50%	Lethal
Xu et al., 2014	S. avenae	dsRNA constitutive expression in Triticum aestivum	Carboxylesterase (CbE E4)	Whole body	30 to 60%	Reduced fecundity
Mao & Zeng, 2014	M. persicae	dsRNA constitutive expression in N. tabacum	Hunchback	Embryo	30%	Reduced fecundity Reduced biomass production
Sapountzis et al., 2014	A. pisum	dsRNAs Injection and feeding	Cathepsin-L	Gut, head and carcass	Depending on administration mode and body part	Molting and gut epithelial cells defect
Guo et al., 2014	A. pisum	dsRNA injection	Cystein-rich protein	Salivary glands	32%	No phenotype
Guo et al., 2014	M. persicae	dsRNA (hp or amiRNA) constitutive expression in N. tabacum	V-ATPase RR1 cuticle protein 40S ribosomal protein Actin dependent regulator of chromatin Tubulin folding co-factor Coatomer subunit Ribosomal protein S14 Mediator complex subunit 31 Acetylcholinesterase	Not documented	0-20% AChE Not shown for others	30% reduced fecundity (higher aphid resistance with amiRNA) Caution: control empty vector-transformed plants
Zhang et al., 2013	S. avenae	Feeding on artificial media with dsRNA	16 genes + SaC002	Gut	De 20 à 80%	60-90% Lethal

Modifié d'après Brisson, Jaquiere, Legeai, Le Trionnaire, Tagu, unpublished)

Les causes possibles d'un échec?

Dégradation des dsRNA par des protéines salivaires et dans le corps du puceron

Christiaens et al., 2014



Dégradation plus importante des dsARN dans le milieu ayant servi à l'acquisition de dsRNA par les pucerons

Fig. 1. DsRNA degradation by salivary secretions during feeding by the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). Forty nanograms of dsEcR were added to 130 μ L artificial diet and the stability of the dsRNA in the diet on which pea aphids were feeding was compared to that in the diet on which no aphids were feeding. Afterwards, dsRNA was purified from the diet using the RNeasy kit (Qiagen) and run on a 1.5% agarose gel.

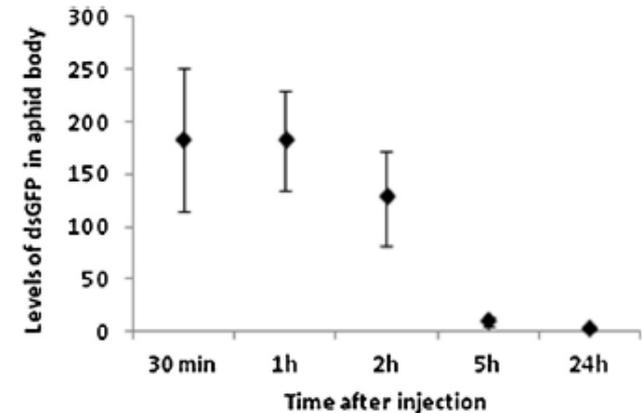


Fig. 3. *In vivo* persistence of dsRNA in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). 180 ng dsGFP was injected into L3/L4 nymphs and the fate of dsRNA was followed by a qPCR approach. Samples were taken at the different time points, RNA was extracted and the sample was incubated at 75 °C for 10 min just before reversed transcription to denature the dsRNA. The levels of remaining dsGFP in the cDNA were then analyzed with PCR. Data is normalized against a reference sample. Values are mean \pm SEM based on three biological replicates.

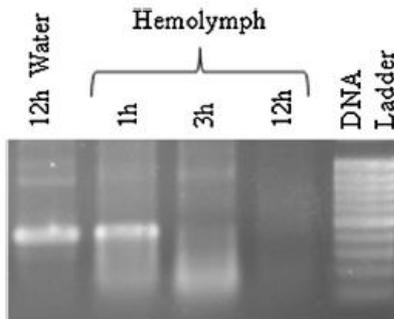


Fig. 2. *Ex vivo* degradation of dsRNA by pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) hemolymph. An amount of 500 ng dsEcR was incubated in either 3.5 μ L of RNase-free water during 12 h or in 3.5 μ L cell-free hemolymph as collected from adult aphids, during 1, 3 and 12 h. Afterwards, dsRNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen) and run on a 1.5% agarose gel.

Dégradation rapide des dsRNA après incubation avec hémolymphe du puceron

Dégradation rapide des dsRNA dans le puceron après microinjection

Notes Identification de 2 gènes chez *A. pisum* pouvant correspondre à des dsRNases (homologie avec dsRNases de *B. mori*)
 Identification d'un homologue de Eri-1 de *C. elegans* (nucléase responsable de l'échec du mécanisme de RNAi chez *C. elegans*)

Donc solution d'acquisition à renouveler régulièrement

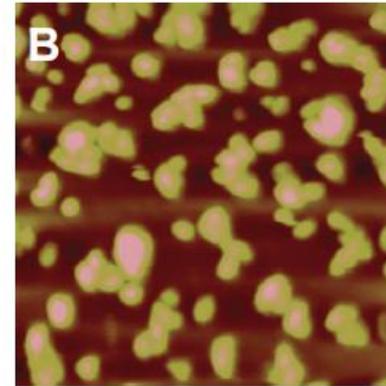
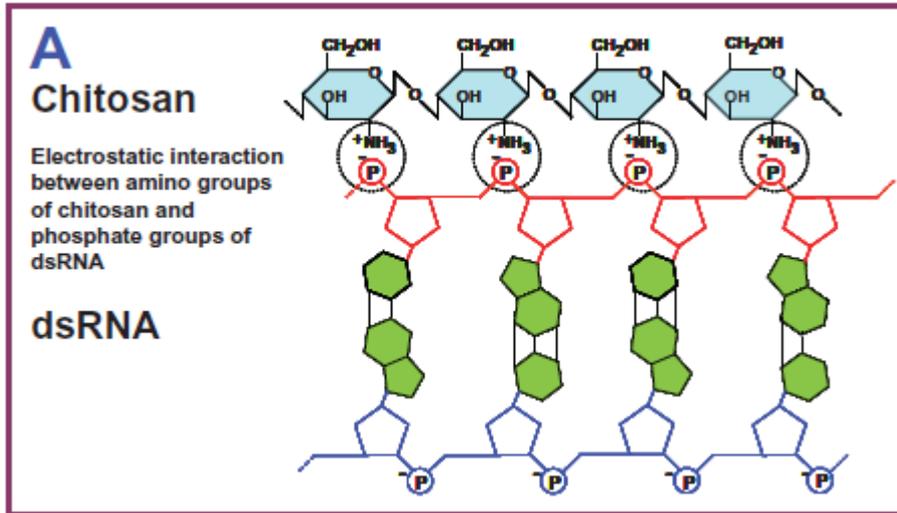
Véronique Brault



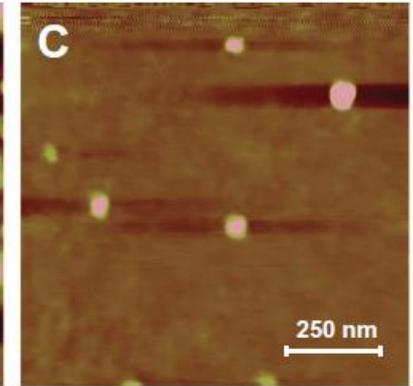
Vers de nouvelles techniques d'acquisition de siRNA?

nanoparticules

→ dsRNA ciblant *chitin synthase genes* dans des nanoparticules de chitosan: acquisition orale par les moustiques (Zhang et al., 2010)



Nanoparticules
de 100 à 200 nm



Sans dsRNA

Répression des gènes de 50 à 60%

Utilisé chez les moustiques car limite la dissolution des dsRNA dans l'eau

Favorise l'internalisation des dsRNA par endocytose

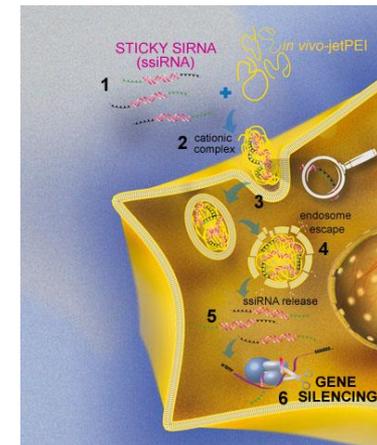
STICKY siRNA™ + in vivo-JetPIE™

Formation de concatémères de siRNA

Puis formation de nanoparticules

Augmentation internalisation siRNA

Augmentation efficacité du « gene silencing »

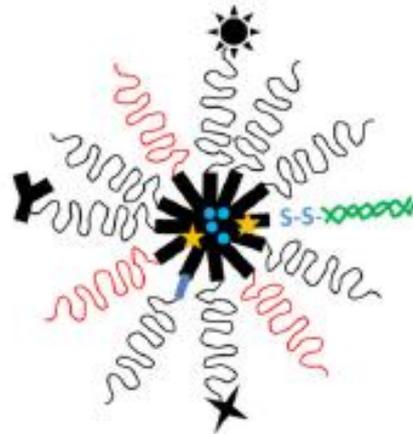


Véronique Brault

Vers de nouvelles techniques d'acquisition de siRNA?

micelles

- Conjugaison des siRNA avec PEG ou lipides
- Condensation avec cations pour former des micelles
- Internalisation des micelles par endocytose
- Libération des endosomes avant leur transformation en lysosomes
- Possibilité de greffer sur micelles molécules de reconnaissance (protéines, anticorps,...)



Jhaveri and Torchilin, 2014

 S-S- siRNA linked by reducible disulfide linkage

 Contrast moiety for imaging

 pH-sensitive polymer

 Polymer for long circulation (e.g. PEG)

 stimuli-sensitive block (intrinsic or extrinsic stimulus)

 Receptor targeted ligand (E.g. transferrin, folate)

 Antibody

 Cell-penetrating function

 Hydrophobic drug

Y'a plus qu'à et ...



Merci pour votre attention!