

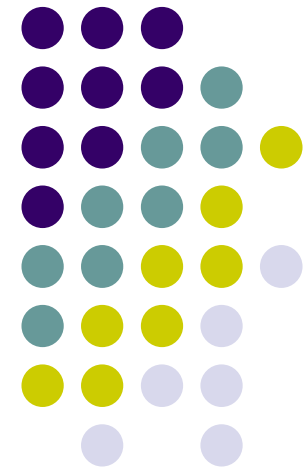
Mise au point de vecteurs permettant une expression fiable de gènes codant pour les ARN interférents et des microARN

Coordinateur-Equipe 1: Fabienne LE PROVOST, LGbC

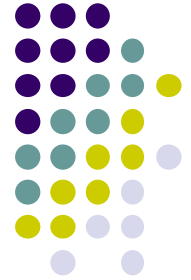
Equipe 2: Geneviève JOLIVET, BDR,

Equipe 3: Hubert LAUDE, VIM,

INRA, Jouy-en-Josas

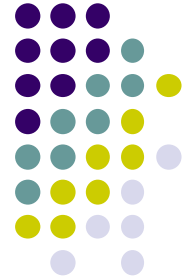


But du projet



- Définir la meilleure stratégie de vecteur pour produire un ARN interférent en transgénèse permettant l'inhibition d'un gène cible.

Modèles d'étude



- Gène IE180 (immediate-early gene) du virus de la maladie d'Aujeszky.
- Gène Prnp impliqué dans les maladies à Prion.

Construction d'un transgène

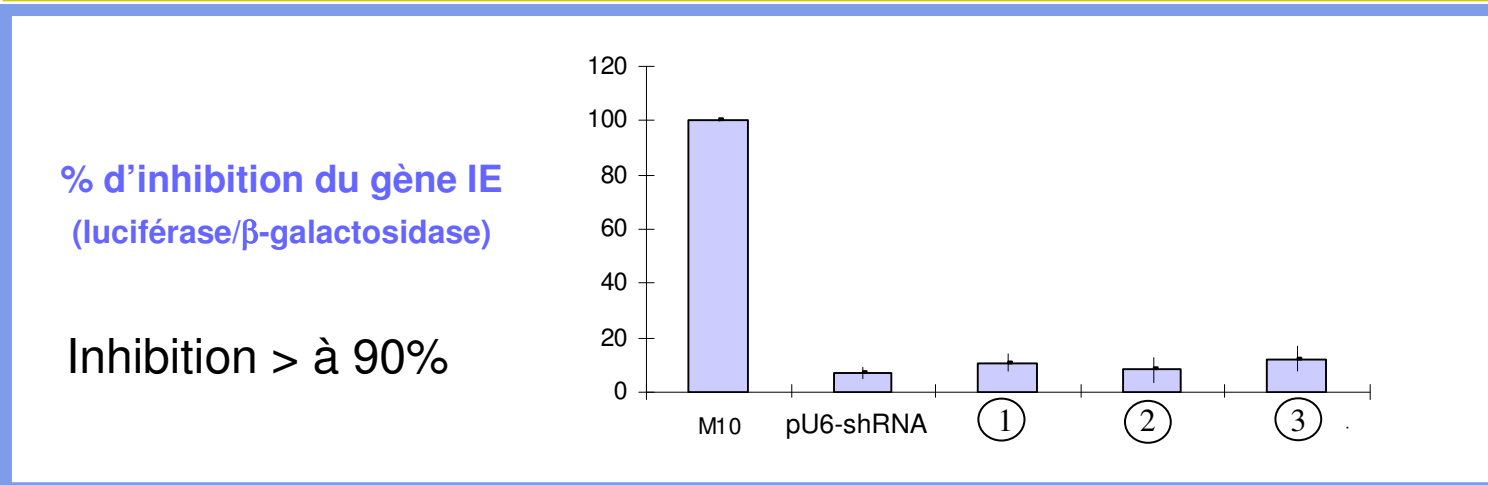
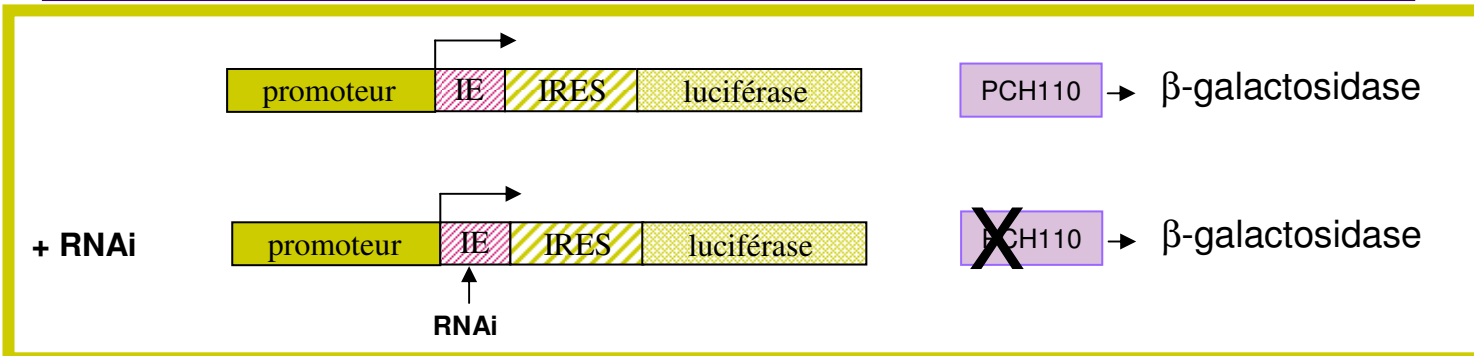
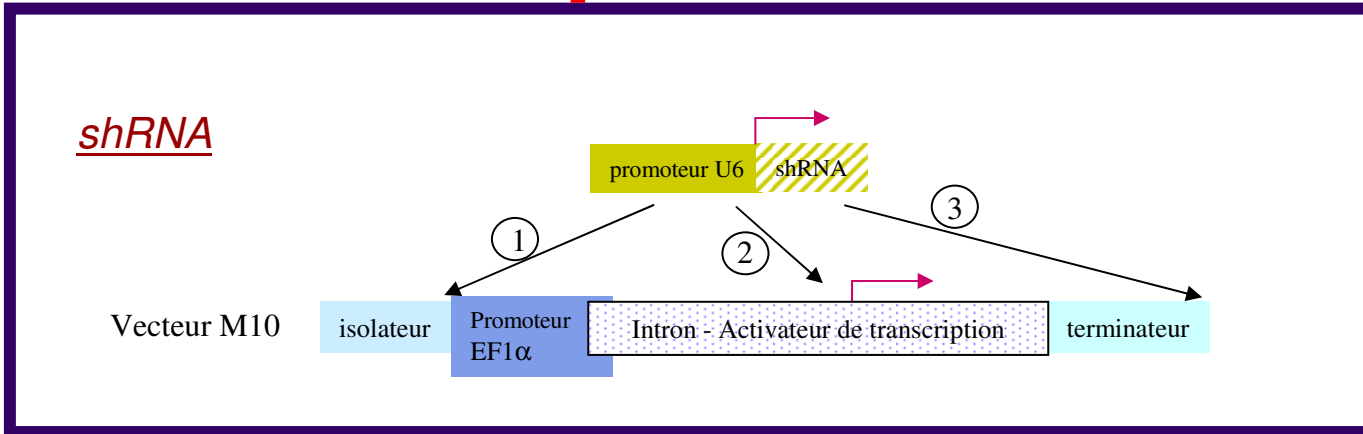


- Le promoteur :
 - Type pol III : fort, ubiquitaire, production de shRNA
 - Exemples : U6, H1
 - Type pol II : tissus spécifiques, polyadénylation, production de microARN
- Le transgène : ARN interférent :
 - shRNA (seul, + 5T)
 - microARN
- La cible : 3'UTR ou codant

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell				
	Tg				
pol III	cul cell				
	Tg				

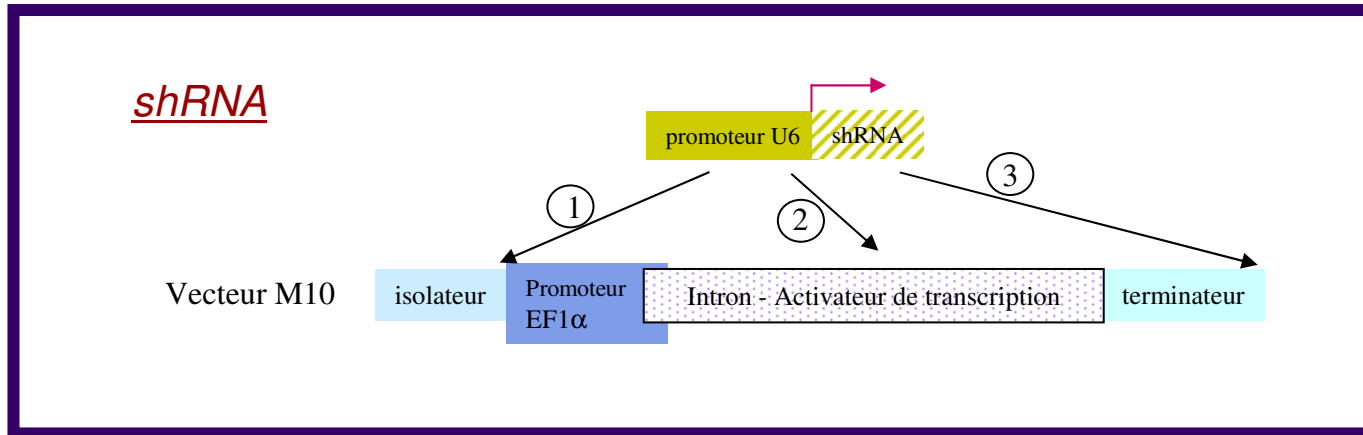
Promoteur pol III : U6

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell				
	Tg				
pol III	cul cell	X			
	Tg				



Promoteur pol III : U6 Transgénèse

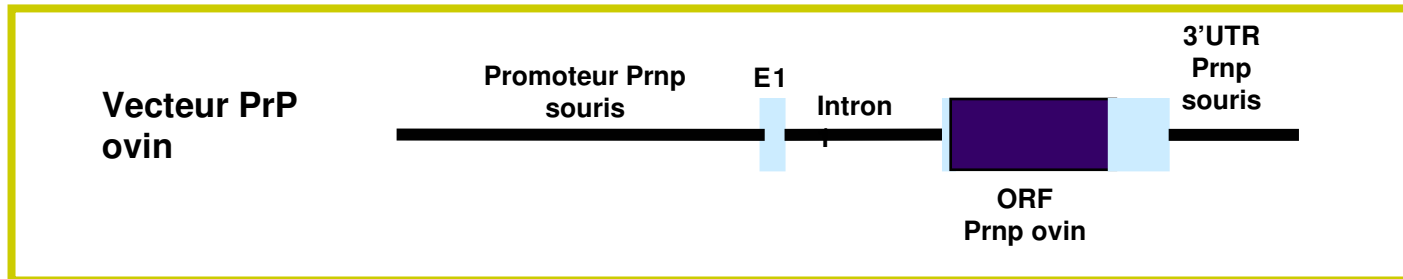
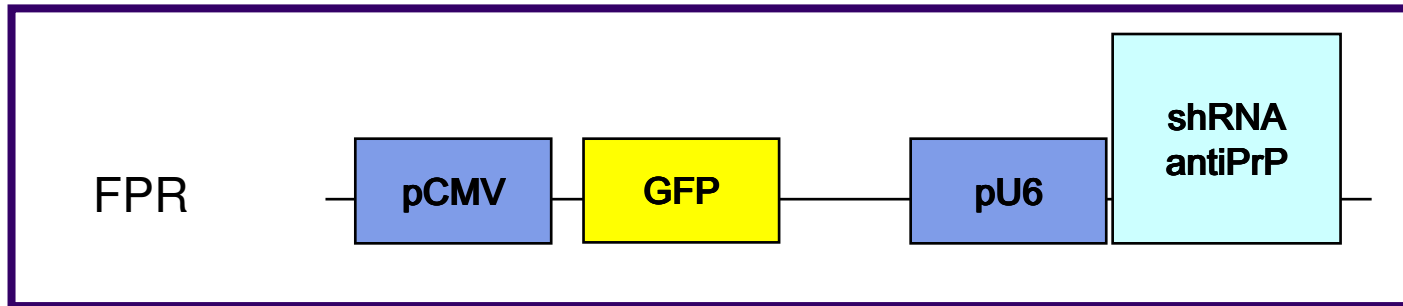
		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell				
	Tg				
pol III	cul cell	X			
	Tg	X			



M10-pU6- shRNA : 3 animaux TG sur 180 analysés: pas d'expression de shRNA, transgène tronqué.

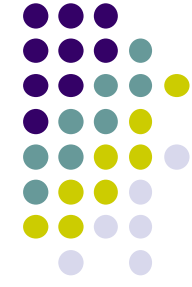
Promoteur pol III : U6

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell				
	Tg				
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		

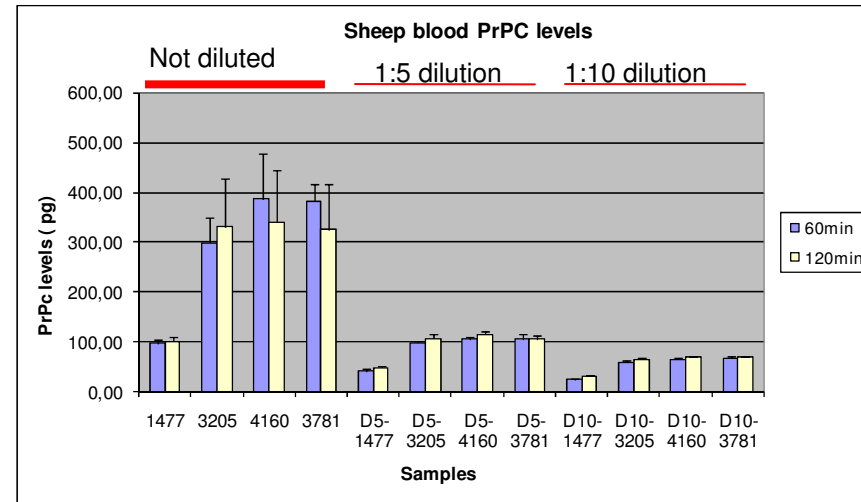
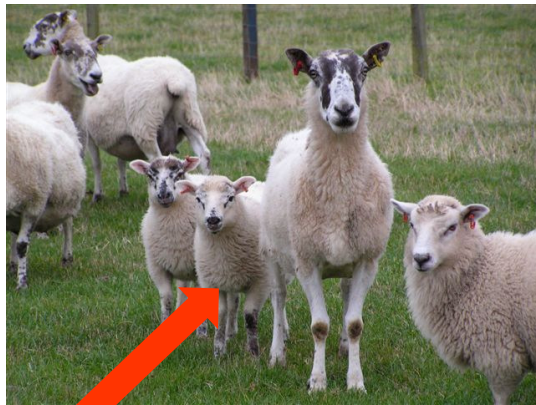


- In vitro : Inhibition protéique > 80%
- En transgénèse : pas inhibition (7 lignées)

Moutons transgéniques obtenus à l'aide de lentivirus porteur d'un shRNA anti PRP



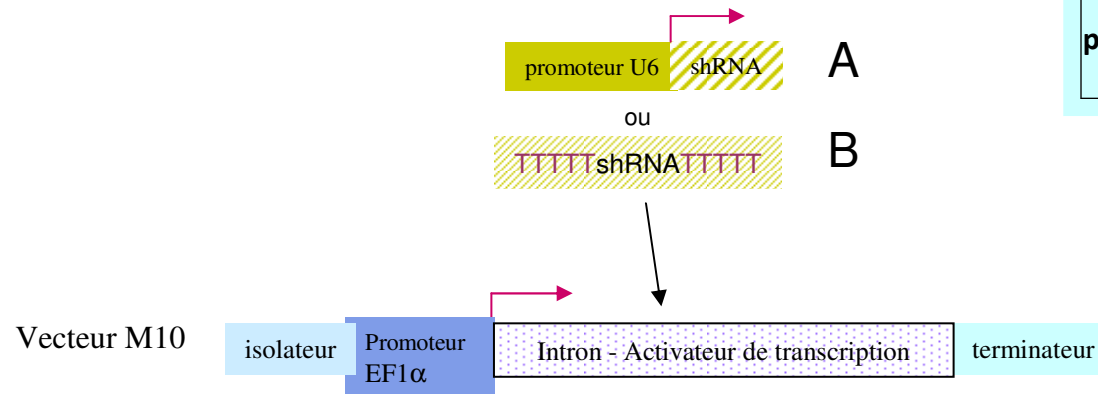
Construct	RNAi	GFP
Injected	258	81
Blastocysts	104	27
Transferred	67	18
Born	27	5
Transgenic	1	2



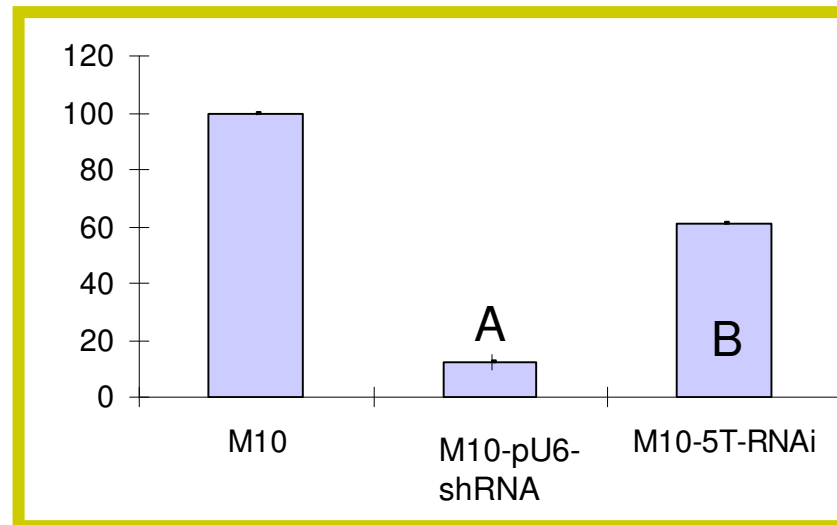
Collaboration avec Bruce WHITELOW, Roslin Institute,

Promoteur pol II : EF1 α

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X			
	Tg	X			
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		



% d'inhibition du gène IE
(luciférase/ β -galactosidase)

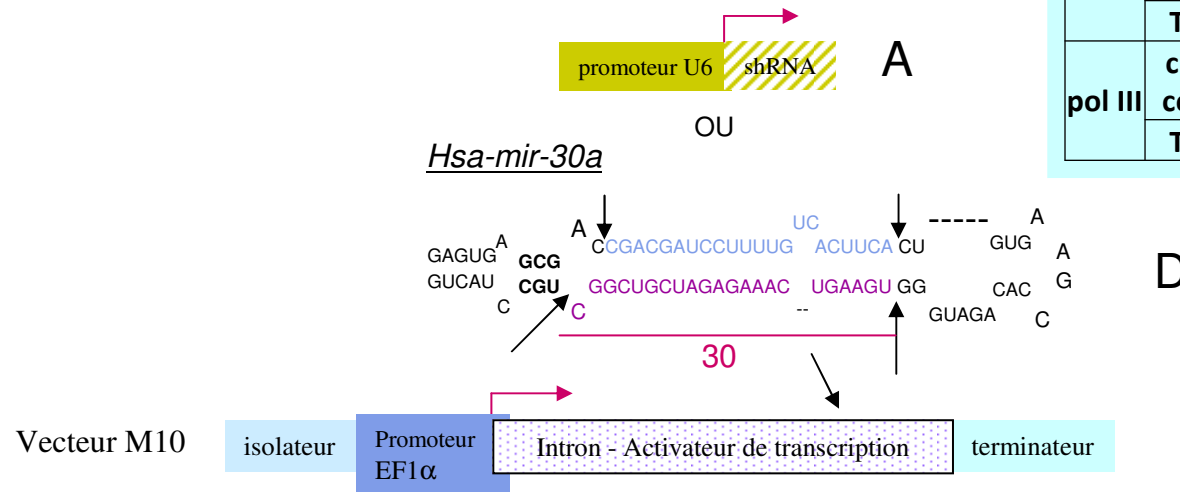


En transgénèse:

5T-shRNA-5T dans M10 :

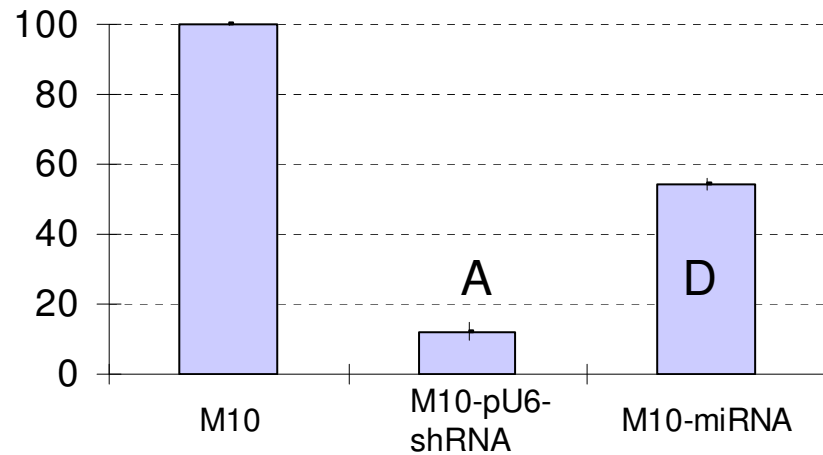
2 animaux TG sur 150 analysés: pas d'expression, transgène tronqué.

Promoteur pol II : EF1 α

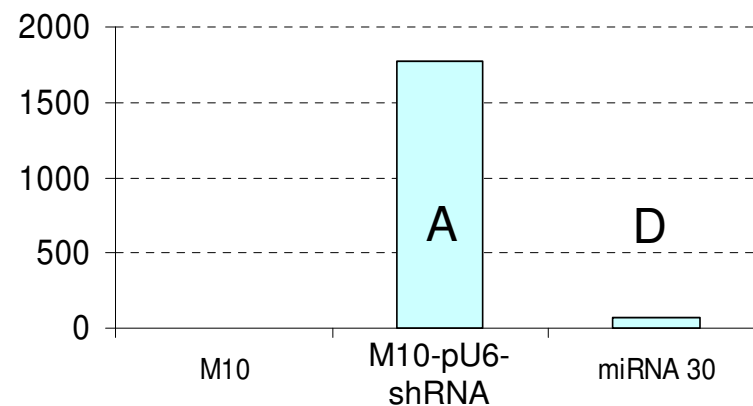


		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X		X	
	Tg	X			
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		

% d'inhibition du gène IE
(luciférase/ β -galactosidase)

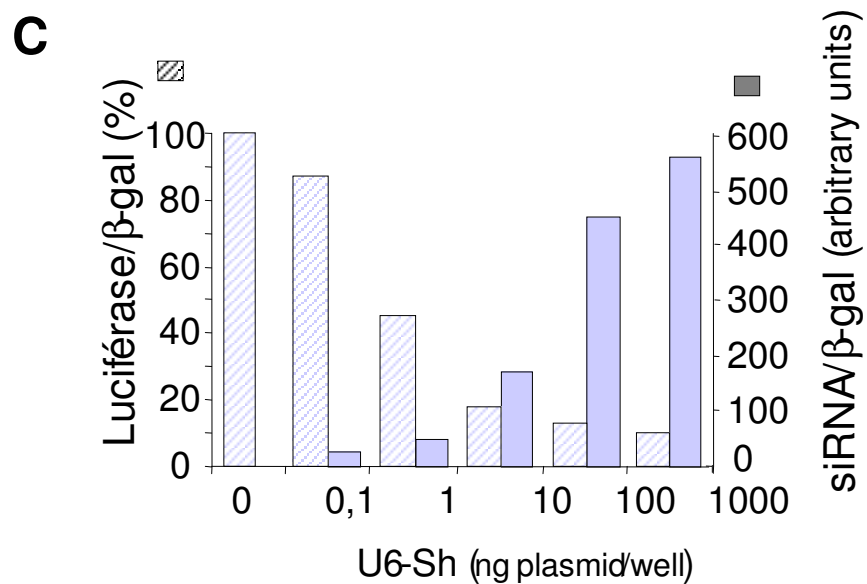


Quantification des RNAi par PCRQ
(RNAi/ β gal)





Effet de la quantité de shRNA / cible



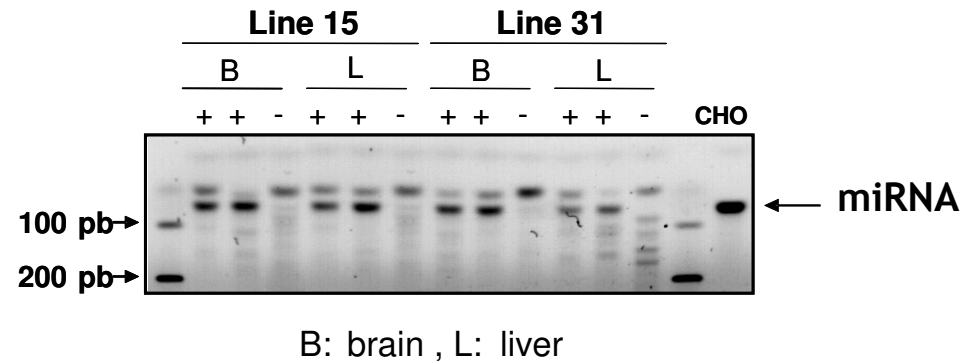
Corrélation entre le niveau de shRNA exprimé et le niveau d'inhibition de la cible

Promoteur pol II : EF1 α

En transgénèse :

- miR dans M10 : 7 lignées sur 50 animaux dont 2 transmettent et expriment le Tg.

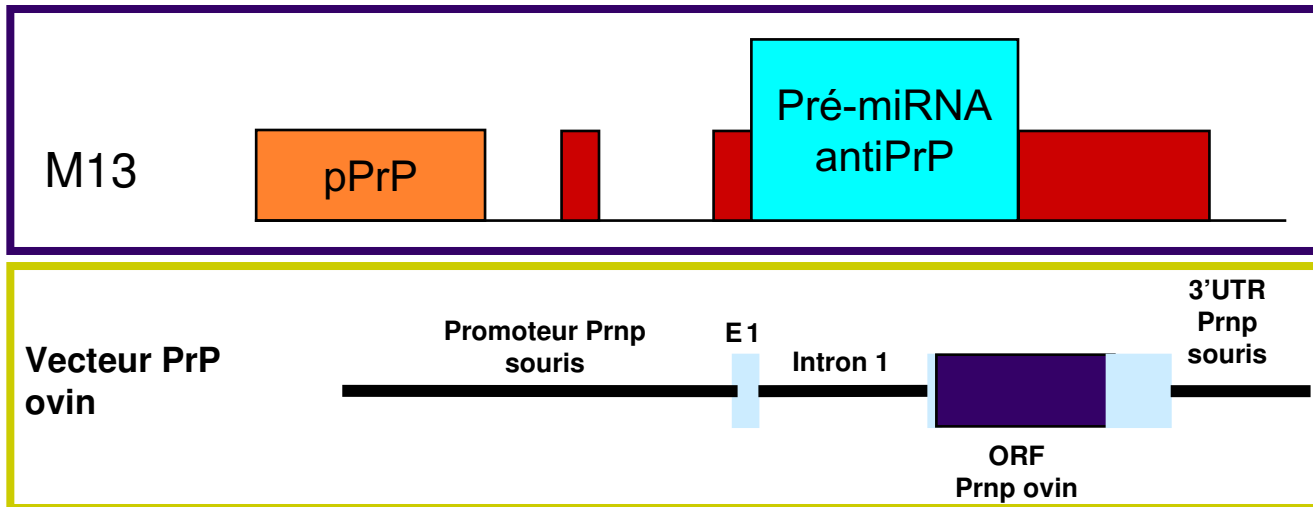
		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X		X	
	Tg	X		X	
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		



- Challenge

	Total	mice alive
control	24	7
L31	24	8
L15	24	15

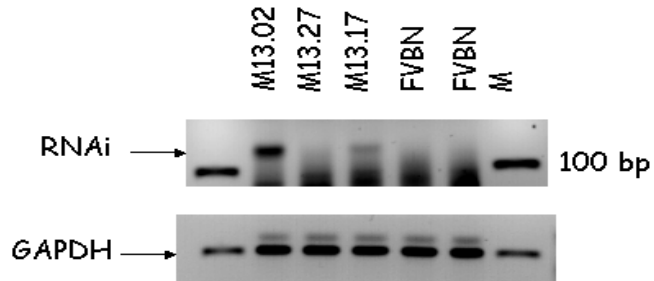
Promoteur pol II : PrP



		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X		X	X
	Tg	X		X	X
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		

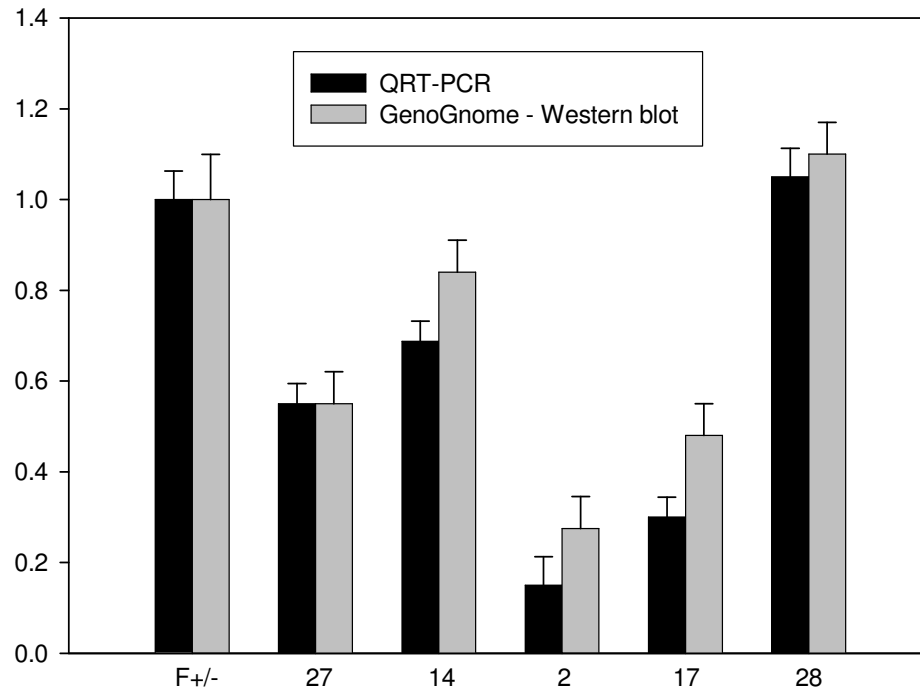
- Lignées transgéniques :
 - Obtention de 8 lignées : 4 expriment le Tg à des niveaux variables

Promoteur pol II : PrP



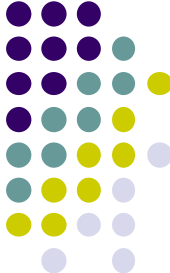
Détection du miRNA mature par RT-PCR quantitative.
 Détection du miRNA produit par la construction M13
 dans le cerveau de 3 lignées de souris transgéniques.

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X		X	X
	Tg	X		X	X
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		



Quantification de la diminution du transcrit (QRT-PCR)
 et de la protéine (Western blot) PrP observée
 dans les différentes lignées de souris M13.
 F+/- : souris contrôle FVB/N Prnp+/-.

Différentes régions cibles



RNAi choisis sur la partie traduite

```

gcttataagc gcggtctcca tegtageact tCACTGCGGT GCAGGTACGG ACAGCATCGT
TCTCTGCCAA CCGGAGGGGA TCCGACCGTC TCCGCTCCGG CCGCGACTCT GAAGACTCCG
GCTCTCCGGC GGCTATCAGC CCTCGACGGA CGCCCGACCC ACCGAGGCTC TCGGGCGGC
AGAGAAGAGT CTTCTTCTTC TCCTCTCTC G CCGCGCTTCC TCCTTCTTCT CCGCGCGCCG
CTCTCCGCGC TCGGCGCCCG GCCTCGCTCA GGCAGAAAGA CCCCATCGA GACCATGgcc
GACGATCTCT TTGACTTCA CGAGACCGAG GGCAACTTCA GCCAGCTCCT GCGGCGCGCC
GCGCGCGCCG AGGAAGAGGG CATCGCGTCC GGCCCGGAGC GCGGCAGCCA GGGTCCCGG
CGCCGCGGCT CCTCCGGCGA GGATCTCCTC TTCGGCCCGG GCGGCCTCTT CTCCGACGAC
    
```

ASSR1

SH

RNAi choisis sur la partie non traduite 3'UTR

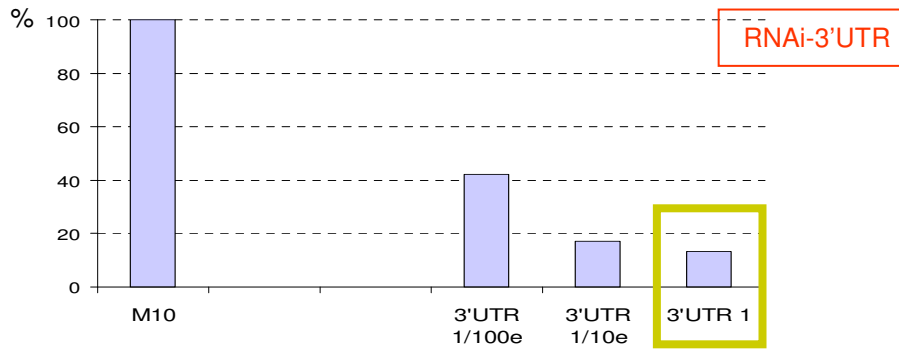
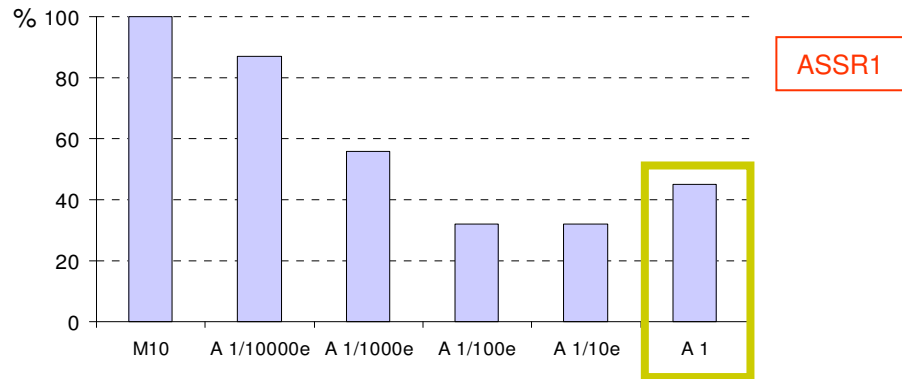
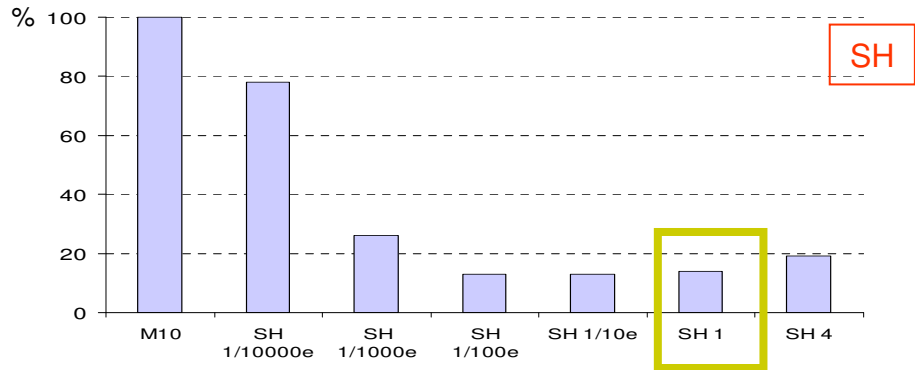
```

.... etgetgetee GC TGA GCGGG GCGCCCCCTC GGCCCGGCGG GACTCTGACT CTGACTCTCC
GGCCCCCTCCA CCGGCTCCTC GAGGCCCTTC TCCTCCGTCT TCTCTCCCTC CGCCCTCGGC
CCGGTCTCTG TCCTCGTCTC CGTCCCTCTC CCGGCTCTCC TCCTCTCTG CGTCCGCGGC
GGCGGCCTCG GTCCCTCGG CCGGCGGGCG CTTGCCTCCC CGGCGCTGC CTCCCGGGC
CGGTGGCCCT CCTCTCTCC TTCTCCTCCG CCGGATCCC CCGGCGGGAG GTGGCTGCGG
CGGCGGCGGA GGTGGCGGCG GTGGTGAAG CCGGCGGCGC GCGCGGCGG GAGGGCTCGG
CGGCGGAGGA TCGTCCCGGT CCCCTTCTCC TCCTCCGCGG GTCCC CGGT CCCCTTCTCC
TCTCTCTCC ATCGGGTGA AAA AGAGTTT GTTTCAGAG TGAGAAAATA AAGTTTGTG
TGTATTTTCT GAACCACTC GAGTCTCTGA GATTTTTTGG GGAGATGGAG GCGGCCATCT
TGGCGGTGGT CTCTGGGGTG GAGGTGGTCT TGTGGATGGG GGTCCCTGGT GGGAGGAAGA
AGAAGAGGTG GAGGGTCTTG GTGGGGGTGA CCGGGGTCTT CCTCCTGGAG GGTCTTGGTG
GTGGTATGG GAAGAAGTGG ATGGGGGTCC TCCTCTGGA GGTCTTGGT GGTGGTGGT
CTTAGCAGAT GGGGGGTCCC TGGTGGGTCT TAGCAGATGG GGTCTCTCT CCTGGAGGT
CTTGGTGGGA AGAAGTAGAG GGTCTTGGGG ATGTGGGGG TCCTTGATGG TGGTGGTGGT
GGTGGTGGGA GGTGGACGGT GTTGGTGGTC CCGGCGGGTC CTGGTGGGAG GTAGATGGT
CCGAGGGTCC CGGTGGTCCC GGGCGGGAGT TGGACGATGG TGSTCCTGCG GTGGTGGAG
    
```

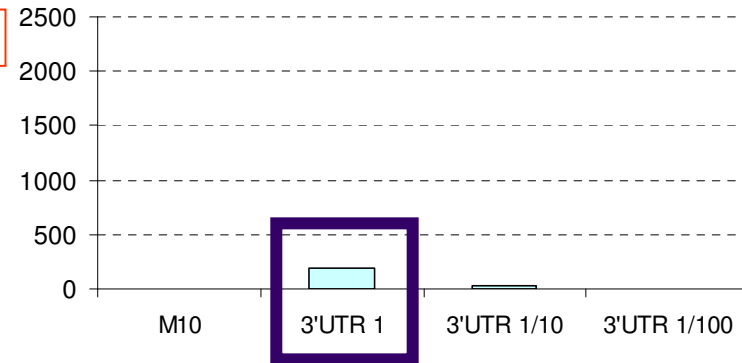
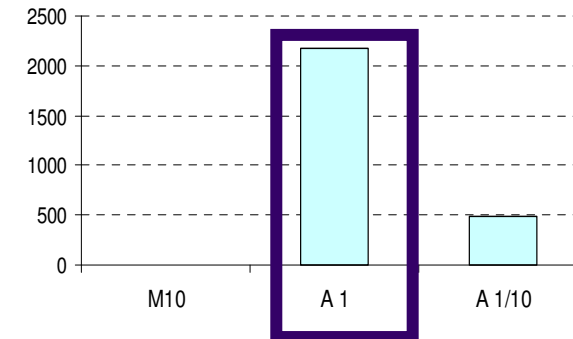
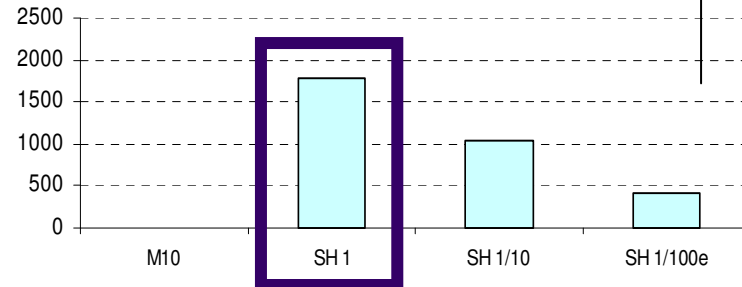
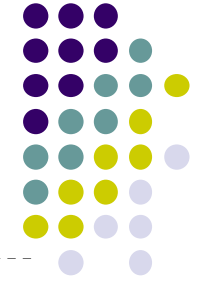
RNAi-3'UTR

RNAi-3'UTR

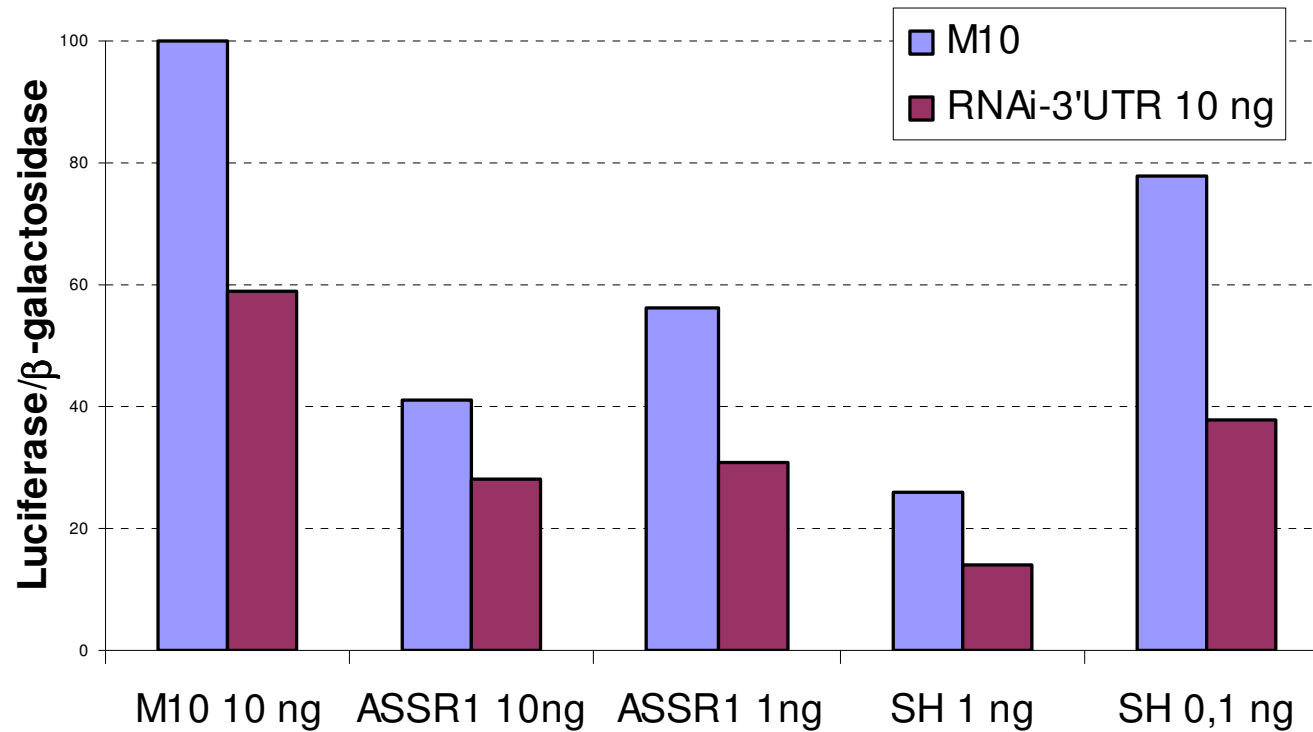
% d'inhibition du gène IE
(luciférase/ β -galactosidase)

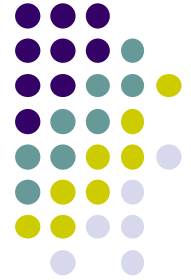


Quantification des RNAi par PCRQ
(RNAi/ β gal)



Inhibition en présence de 2 ARN interférents:





Perspectives

- Obtention de Souris Tg M10-RNAi-3'UTR sur fond sauvage.
- Ces souris seront croisées avec les souris Tg L15 (qui exprime le miR).
 - Double transgénique

Conclusions



- Promoteur pol III

- Forte inhibition en culture cellulaire
- Non adapté en transgénèse :
 - Toxicité du shRNA: concentration trop forte, effet off-target
 - Saturation du système de maturation (Dicer/Drosha/RISC).

		shR		miR	
		Auj	PrP	Auj	PrP
pol II	cul cell	X		X	X
	Tg	X		X	X
pol III	cul cell	X	X		
	Tg	X	X		

- Promoteur pol II

- Inhibition importante en culture cellulaire
- Inhibition partielle en transgénèse.

- Choix des cibles

- Le % inhibition varie selon les cibles.

Valorisation



- Thèse de Micaela Gallozi,
 - Analysis of the role of specific cell types in the propagation of the TSE infectious agent, soutenue le 4 février 2008, financement RIVAGE, Action Marie Curie.
- Thèse Ashraf Sawafta
 - Design of vector for the expression of shRNA in transgenic animal, soutenue en mai 2008.
- Prnp knockdown in transgenic mice using RNA interference.
 - M. Gallozzi, J. Chapuis, F. Le Provost, A. Le Dur, C. Morgenthaler, C. Peyre, N. Daniel-Carlier, E. Pailhoux, M. Vilotte, B. Passet, L. Herzog, V. Beringue, J. Costa, P. Tixador, G. Tilly, H. Laude and J.-L. Vilotte, Transgenic Res (2008) 17: 783-791.
- Inhibition of IE (Immediate Early) 180 gene from pseudorabies virus in transgenic mice by RNA interference.
 - N. Daniel-Carlier, A. Sawafta, Fr. Lefèvre, M. Leroux-Coyau, D. Thépot, S. Prince, B. Passet, G. Jolivet, L.-M. Houdebine, 8th Transgenic Technology Meeting (TT2008) 27–29 October 2008, Toronto, Canada (poster).



Laboratoire de Génétique
Biochimique et Cytogénétique

- Fabienne LE PROVOST*
- Micaela GALLOZZI
- Gaëlle TILLY
- José COSTA
- Marthe VILOTTE
- Caroline MORGENTHALER
- Bruno PASSET
- Jean-Luc VILOTTE

* coordinateur

Laboratoire de Biologie du
Développement et Reproduction

- Ashraf SAWAFTA
- Dominique THEPOT
- Nathalie DANIEL-CARLIER
- Sonia PRINCE
- Geneviève JOLIVET
- Louis-Marie HOUDEBINE

Laboratoire de Virologie et
Immunologie Moléculaires

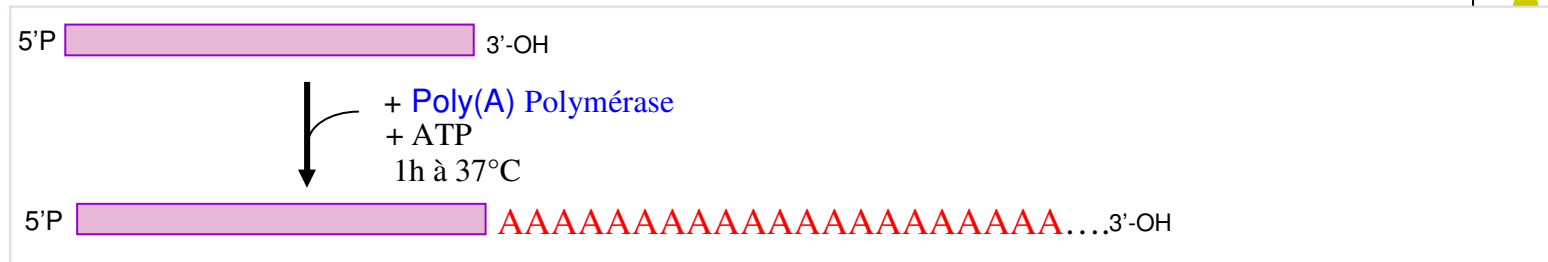
- Jérôme CHAPUIS
- Vincent BERINGUE
- Annick LE DUR
- Hubert LAUDE

INRA
JOUY-EN-JOSAS

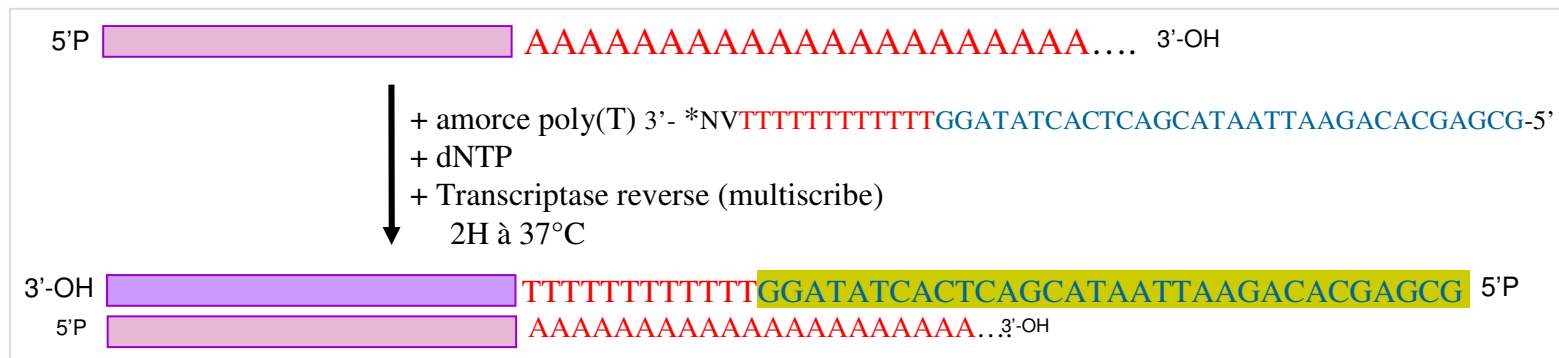
Méthode de détection des ARN interférents en PCR en temps réel



1 Polyadénylation



2 Transcription inverse



3 PCR en temps réel

