

Les ARN non-codants impliqués dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales

Christine Lelandais-Brière^{1,2}, Céline Sorin^{1,2}, Martin Crespi² et Caroline Hartmann^{1,2}

¹ Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris Cedex 13, France

² Institut des Sciences du Végétal (ISV), CNRS, UPR2355, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Auteurs correspondants : Caroline Hartmann, hartmann@isv.cnrs-gif.fr
Martin Crespi, crespi@isv.cnrs-gif.fr

Reçu le 28 novembre 2012

Résumé – Les ARN ne codant pas de protéines (ou ARNnc) ont émergé ces dernières années comme une part essentielle du transcriptome des cellules eucaryotes. Les approches récentes de génomique ont en effet permis de découvrir une grande variété d'ARNnc, de petite ou de grande taille, impliqués dans des réseaux de régulations moléculaires très complexes. Bien que de nombreux longs ARNnc soient régulés en réponse aux stress abiotiques, leur fonction demeure mal comprise. Les petits ARN, quant à eux, sont des acteurs majeurs de la régulation génique aussi bien au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel. Ainsi, plusieurs d'entre eux jouent des rôles essentiels dans la réponse des plantes aux stress. Dans cette revue, nous présenterons certains ARNnc associés aux contraintes environnementales (salinité, froid ou carence nutritionnelle) chez les végétaux. La compréhension des réseaux de régulations liés à ces ARN régulateurs devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes associés à l'adaptation des plantes à leur environnement.

Mots clés : Long ARN non-codant / microARN / régulation post-transcriptionnelle / réponse aux stress / plantes

Abstract – Non-coding RNAs involved in plant responses to environmental constraints.

In recent years, in addition to mRNAs, the non-protein-coding RNAs (or ncRNAs) have emerged as a major part of the eukaryotic transcriptome. New genomic approaches allowed the discovery of many novel long and small ncRNAs that may be linked to the generation of evolutionary complexity in multicellular organisms. Many long ncRNAs are regulated by abiotic stresses although only very few long ncRNAs have been functionally analyzed. On the other hand, small RNAs act in the regulation of gene expression at transcriptional or post-transcriptional level and several among them have been linked to abiotic stress responses. Here we describe various ncRNAs associated with environmental stress responses such as to salt, cold or nutrient deprivation. The understanding of these RNA networks may reveal novel mechanisms involved in plant adaptation to changing environmental conditions.

Key words: Long non-coding RNA / microRNA / post-transcriptional regulation / stress response / plants

Abréviations

ABA :	acide abscissique
AGO :	ribonucléase ARGONAUTE
ARNnc :	ARN non-codant
CSD :	Cu/Zn superoxyde dismutase
DCL1 :	DICER-LIKE 1 (ribonucléase de type III)
HYL1 :	HYPONASTIC LEAVES 1
IPS:	<i>Induced by Phosphate Starvation</i>
LARNnc :	long ARNnc
miARN :	microARN
nat-siARN:	<i>natural antisens siRNA</i>
nt :	nucléotides
Pi :	phosphate inorganique
pri-miARN :	transcrit primaire de microARN
RISC:	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
s_ARNnc :	petit ARNnc
SE :	SERRATE
siARN :	petit ARN interférent
SOD :	superoxyde dismutase

Introduction

Les outils modernes de la biologie permettent d'avoir accès, pour la première fois, à des études globales portant sur l'ensemble des transcrits, des protéines et des métabolites présents dans une cellule. Ces données sont à la base d'une nouvelle spécialité, la biologie des systèmes, qui devrait nous permettre à terme de décrypter les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la physiologie et plus précisément la réponse des plantes aux conditions de l'environnement. Ces contraintes environnementales biotiques (nématodes, champignons, bactéries, virus...) ou abiotiques (carences nutritionnelles, sécheresse, salinité, froid, chaud...) affectent considérablement les rendements des cultures. La réponse des plantes au stress dépend du type de stress, de l'âge de la plante mais également de l'intensité et de la durée du stress. Dans certains cas, il a également été montré que le conditionnement préalable des plantes à un stress particulier permettait à celles-ci de mieux résister ultérieurement à l'application d'un stress du même type. Pour une espèce végétale, certaines variétés sont sensibles et d'autres tolérantes à un stress donné. Dans ce dernier cas, le plus fréquemment, la plante s'adapte aux conditions de l'environnement en modifiant certains de ses paramètres physiques, physiologiques, voire son développement. En effet, chez les plantes, l'essentiel du développement a lieu après la germination à partir de cellules souches localisées dans les méristèmes qui sont mis en place au cours de l'embryogenèse. Cette particularité développementale permet à tout moment une réponse adaptée de la morphologie de la plante aux conditions de l'environnement.

Ces dix dernières années, notre vision des mécanismes à l'origine de l'expression des génomes a considérablement évolué. Ce bond en avant a été rendu possible par la mise en place de nouveaux outils qui sont à l'origine de la « transcriptomique », c'est-à-dire de l'étude de l'ensemble des ARN présents dans une cellule à un moment donné. La dernière génération de ces outils permet même de visualiser les modifications des populations d'ARN d'une seule cellule, lors de l'application d'un stress par exemple. Deux grandes catégories d'ARN existent dans une cellule : des ARNm qui sont traduits en protéines dans le cytoplasme et les ARN non-codants (ARNnc). Ces derniers se subdivisent en ARN non-codants de ménage (ARNt, ARN du spliceosome, ARN guide...) et en ARN non-codants régulateurs. Ils exercent cette dernière fonction soit en agissant directement sur un ARNm (régulation post-transcriptionnelle) soit en intervenant sur leur transcription *via* des modifications de la chromatine (régulation épigénétique). Ces fonctions des ARNnc régulateurs ont été découvertes ces quinze dernières années. Cette revue tentera de faire le point sur la biogenèse et le mode d'action des ARN non-codants régulateurs transcrits par l'ARN polymérase II, lors de la réponse des plantes à des stress abiotiques.

Les ARN non-codants

Chez les eucaryotes pluricellulaires, l'analyse fine du « transcriptome » a permis de montrer que pratiquement tout le génome pouvait être transcrit et que les ARNnc représentaient une proportion de transcrits cellulaires équivalente, voire supérieure à celle des ARNm (Mattick, 2012). Exception faite des ARNnc de ménage, les ARNnc sont caractérisés en fonction de leur taille. Les longs ARNnc (LARNnc) possèdent une taille supérieure à 200 nucléotides (nt) et une phase ouverte de lecture, si elle existe, inférieure à 150 nt alors que les petits ARNnc (s_ARNnc) présentent une taille inférieure à 30 nt. Chez les plantes comme chez les animaux, des LARNnc avec une double fonctionnalité (ARNm et ARNnc) ont également été identifiés (Bardou *et al.*, 2011). Les ARNnc régulateurs sont généralement exprimés dans un type cellulaire particulier lors d'un stade de développement précis ou lors de la réponse à des contraintes environnementales ou nutritionnelles, aussi bien chez les animaux que chez les plantes (Clark & Mattick, 2011).

A. Les longs ARNnc

Suivant la localisation, sur le génome, de la séquence d'ADN (gène) à l'origine du transcrit d'ARNnc (figure 1), les LARNnc se subdivisent en ARNnc intergéniques (1A), introniques (1B) et antisens naturels

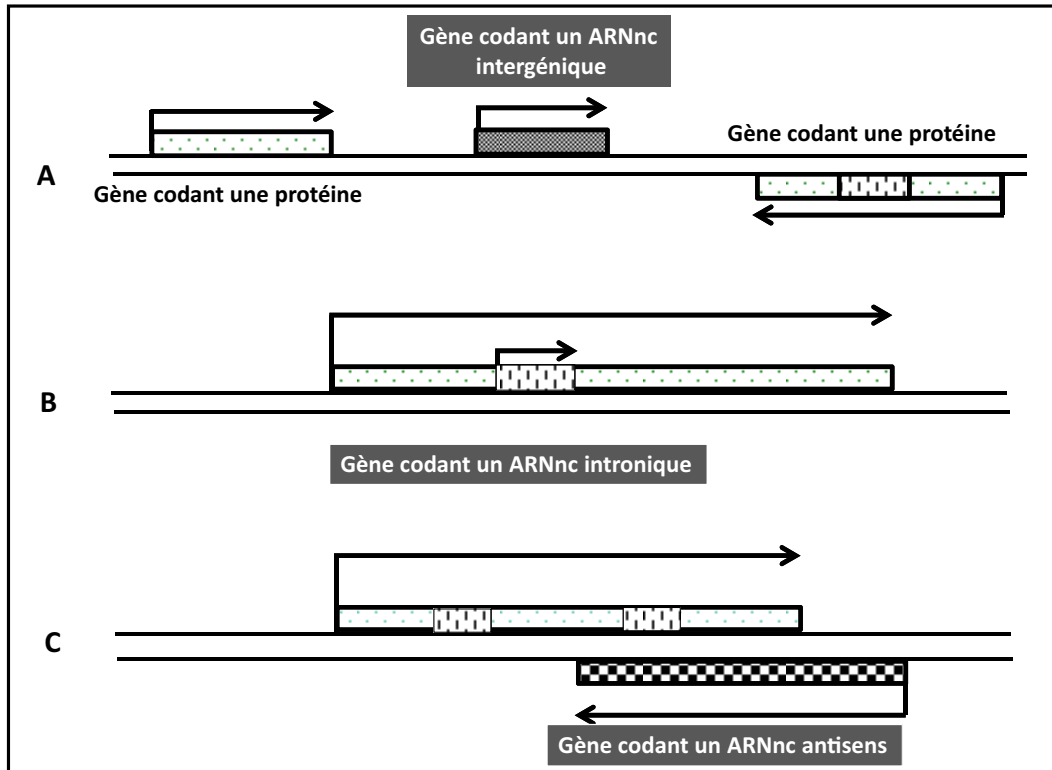


Fig. 1. Schéma du génome et le positionnement des ARNnc intergéniques (A), introniques (B) et antisens (C).

d'un gène présent sur l'autre brin d'ADN à un locus donné (1C). Ces définitions tiennent donc compte des annotations préalables des génomes. Cette contrainte limite considérablement les espèces chez lesquelles ce type d'études globales peut être mené. La population hétérogène des ARNnc actuellement identifiée, aussi bien chez les mammifères que chez les plantes, est transcrite par l'ARN polymérase II (Kim *et al.*, 2011), qui est également à l'origine de la biogenèse des ARNm. La seule différence entre les LARNnc et leurs homologues ARNm est donc l'absence de phase ouverte de lecture de grande taille.

Chez les plantes, l'identification de ces ARNnc a débuté dans notre laboratoire dès 2006 (Hirsch *et al.*, 2006; Ben Amor *et al.*, 2009). Une étude exhaustive chez *Arabidopsis thaliana* a été publiée cette année dans la revue *The Plant Cell* (Liu J. *et al.*, 2012, en ligne). Par contre, la caractérisation de leurs fonctions n'en est qu'à son balbutiement. En effet, à notre connaissance et dans le cadre de la réponse des plantes aux conditions de l'environnement, la fonction de seulement quelques-uns de ces ARNnc a été décryptée. Les ARNnc COOLAIR (*Cold Assisted Intronic non-coding RNA*) et COLDAIR (*Cold Induced long Antisense Intragenic RNA*), identifiés chez *Arabidopsis*, sont induits par le froid lors de la vernalisation et répriment de manière épigénétique le locus *Flower Locus C (FLC)* afin de permettre

ultérieurement la régulation de la floraison par le photopériodisme (Swiezewski *et al.*, 2009; Heo & Sung, 2010).

Dans notre laboratoire, nous avons identifié 76 LARNnc et montré que la plupart étaient régulés par des stress environnementaux (salin, osmotique ou de carence nutritionnelle), notamment dans les racines, ce qui nous a permis de proposer un rôle pour ces ARN dans l'adaptation de la croissance racinaire à l'environnement du sol (Ben Amor *et al.*, 2009). L'étude exhaustive portant sur 200 analyses de « transcriptome » suivie d'une vérification des résultats par un séquençage mené sur des échantillons d'ARN par la technique de « RNAseq » a permis à l'équipe de Chua (Liu J. *et al.*, 2012) d'identifier 6480 LARNnc intergéniques dont certains présentent une expression spécifique dans un organe donné, par exemple 221 sont spécifiques de fleurs tandis que 270 sont transcrits essentiellement dans la racine.

Quelles sont les fonctions assignées aux LARNnc dans la littérature ? À l'heure actuelle, chez les plantes, nous ne disposons que de très peu d'informations. Les grandes fonctions associées à ces ARNnc ont été découvertes chez les mammifères et chez certains champignons comme la levure. Les expériences fonctionnelles, menées sur un petit nombre de ces LARNnc, montrent des interactions fréquentes entre ces ARNnc et des enzymes connues pour modifier la

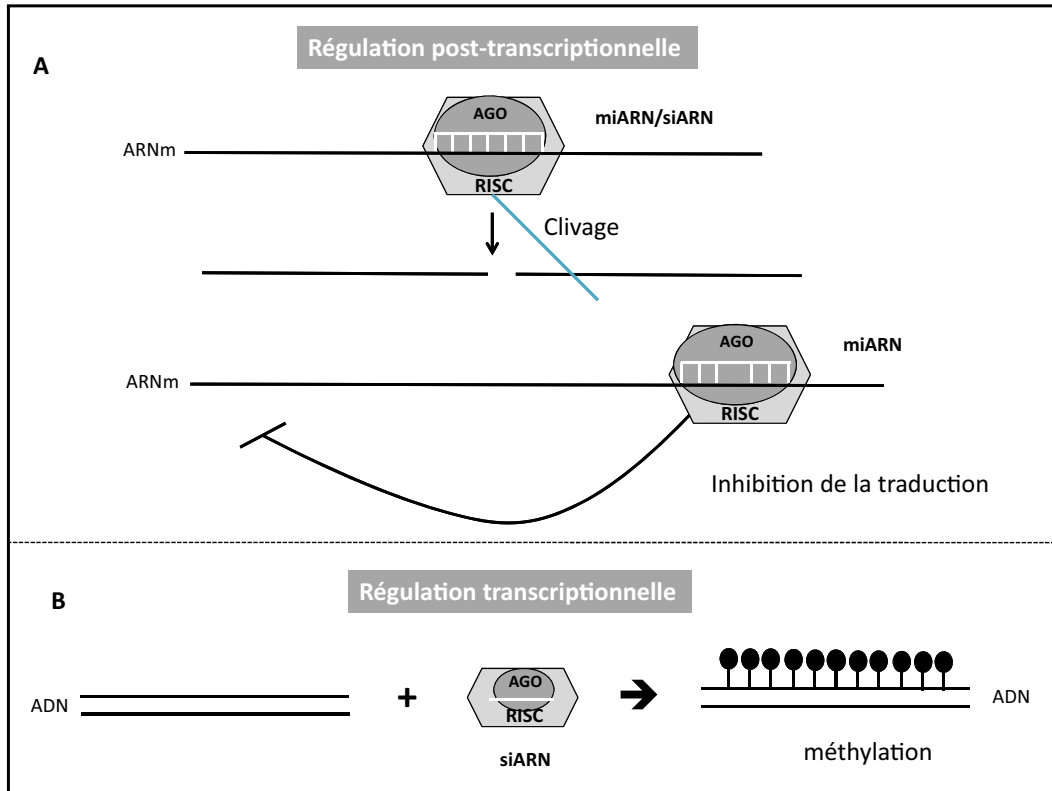


Fig. 2. Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et transcriptionnelle dépendants des petits ARN (miARN, nat-siARN et siARN). Les miARN ou siARN sont déposés dans le complexe protéique RISC contenant la ribonucléase AGO qui recrute ainsi les ARNm complémentaires au siARN/miARN. Ceci induit le clivage ou l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible (mécanisme post-transcriptionnel). Alternativement, les siARN dans le noyau provoquent un changement de la méthylation de l'ADN (changement épigénétique) à travers la reconnaissance des LARNnc produits par les régions cibles du génome et le recrutement de la machinerie de méthylation (régulation transcriptionnelle).

chromatine, suggérant que ces ARNnc pourraient intervenir sur la structure et la fonction de cette dernière (Magistri *et al.*, 2012). Leurs origines génomiques (antisens ou intergéniques) semblent impacter leurs modalités d'action. En effet, les LARNnc antisens régulent généralement, en *cis*, les gènes avec lesquels ils partagent une partie de séquence alors que les LARNnc intergéniques affectent l'expression d'un ou de plusieurs gènes éloignés; ils exercent donc une action en *trans* (Magistri *et al.*, 2012).

B. Les petits ARNnc

Chez les plantes, les sARNnc de 21 à 24 nt sont capables de réprimer l'expression de certains gènes. Ils exercent cette fonction soit directement sur l'ARNm dans le cadre d'une régulation de type post-transcriptionnel (*Post Transcriptional Gene Silencing* ou PTGS) soit en permettant des modifications de la chromatine qui empêchent la transcription de certains gènes (*Transcriptional Gene Silencing* ou TGS) comme indiqué dans la figure 2. Chez les plantes,

il existe deux types de petits ARNnc régulateurs qui se distinguent essentiellement par leurs modes de biogenèse et de fonctionnement : les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN). Les miARN sont générés à partir d'un long transcrite simple brin comportant une petite structure tige-boucle alors que les siRNA sont toujours produits à partir de longs ARN double brin. À l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul type de miARN alors que plusieurs formes différentes de siARN ont été caractérisées chez les plantes (Voinnet, 2009). Les miARN et les siRNA jouent un rôle important dans la réponse des plantes aux stresses tant biotiques qu'abiotiques. Cependant, dans un souci de clarté, nous nous limiterons, dans cette courte synthèse, aux rôles des miARN et des nat-siARN (*natural antisense siRNA*) identifiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Les microARN

Les microARN sont codés par des gènes qui possèdent certaines caractéristiques communes avec les gènes

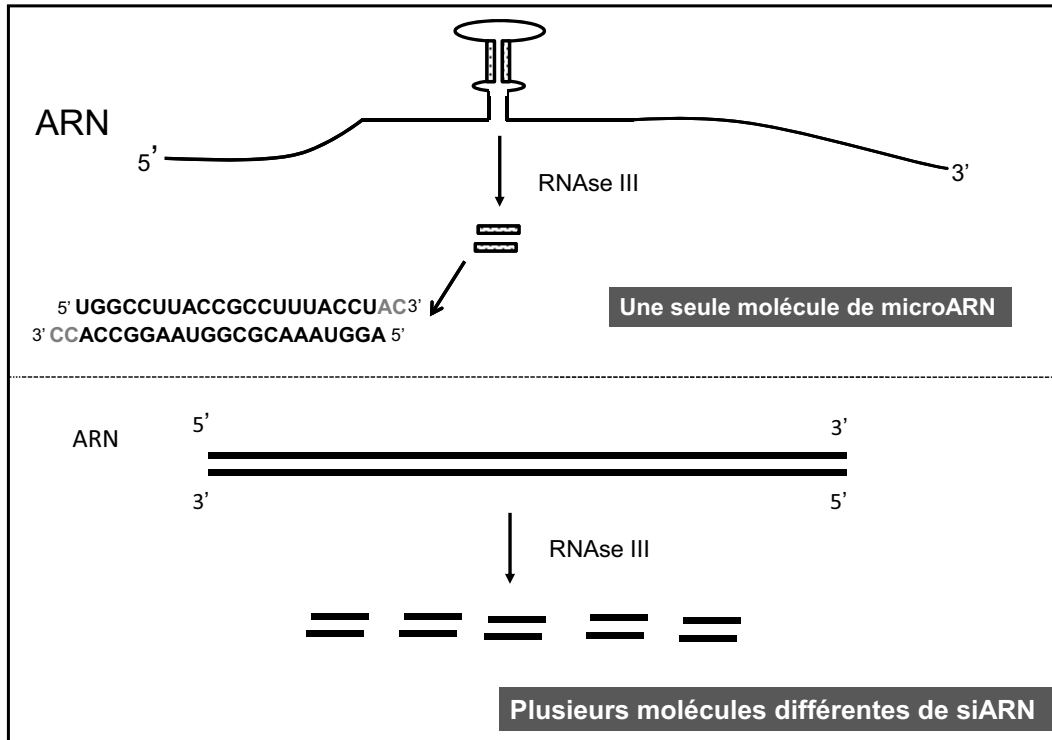


Fig. 3. Biogénèse des miARN et siARN. Les miARN sont synthétisés à partir d'une molécule unique d'ARNm capable de former une région double brin. Par contre, les siARN sont générés à partir d'ARN double brin (formés à partir des ARN sens et antisens ou par l'action des polymérase qui copient l'ARN « *RNA-dependent RNA polymerases* ») et donnent naissance à plusieurs molécules de siARN tout au long de la région double brin.

codant des protéines, plus particulièrement au niveau de leur promoteur et du mode de recrutement de l'ARN polymérase II (Kim *et al.*, 2011). La transcription des gènes miARN est à l'origine de longs transcrits primaires, les pri-miARN (figure 3), qui comportent une structure en épingle à cheveux double-brin. Chez les plantes, les deux étapes de maturation du pri-miRNA ont lieu dans un compartiment sans membrane du noyau appelé focus-D (ou *dicing bodies*) car il comporte l'ensemble de la machinerie de maturation des s-ARNnc. L'élément principal de ce dispositif est une ribonucléase de type III, la DICER-LIKE 1 (DCL1), associée dans un complexe à deux protéines dont les fonctions exactes sont mal connues : HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) et SERRATE (SE). Il existe généralement un seul focus-D de 0,2 à 0,8 μm par noyau, localisé à proximité du nucléole (Liu Q. *et al.*, 2012). L'enzyme DCL1 est capable d'hydrolyser des ARN doubles-brins. La signature moléculaire de son action est la présence sur l'ARN hydrolysé d'extrémités 3' protubérantes de 2 nt. La première étape de maturation, le clivage de la tige-boucle, est réalisée par le complexe DCL1-SE-HYL qui interagit avec des protéines se fixant spécifiquement sur la coiffe du pri-miARN. L'interaction avec ces protéines CAP BINDING (CBP20 et CBP80) semble primordiale ; en

effet, chez les mutants correspondants, l'accumulation des miARN est considérablement affectée (Laubinger *et al.*, 2008). Le pré-miARN généré, correspondant *grosso modo* à l'épingle à cheveux, est assujéti à un deuxième clivage par le complexe DCL1-SE-HYL qui va permettre d'extraire, de la structure tige-boucle, le duplex de 21 nt correspondant au miARN mature. Avant d'être activement exportée vers le cytoplasme par le transporteur HASTY (HST), chez les plantes, une méthyltransférase appelée HUA ENHANCER 1 (HEN1) dépose un groupement méthyl sur les extrémités 3' des ARN du duplex. Cette dernière étape protège le miARN mature de la dégradation (Li *et al.*, 2005). Dans le cytoplasme, un des deux brins du duplex (figure 2), le brin miARN, est incorporé dans un énorme complexe appelé RNA INDUCED SILENCING COMPLEX (RISC) qui comporte toujours une protéine de la famille ARGONAUTE (AGO). C'est ce brin miARN, chargé sur la protéine AGO, qui va être capable de sélectionner, par hybridation de type Watson-Crick, un ARNm particulier sur lequel va s'exercer la régulation. Chez les plantes, un clivage de l'ARNm cible est généralement responsable de la régulation post-transcriptionnelle par un miARN ; cependant, dans certains cas, une inhibition de la traduction ou encore un mélange des deux mécanismes

ont été observées (Voinnet, 2009). À l'heure actuelle, les gènes codant pour des miARN sont divisés en deux catégories : les gènes codant des miARN conservés, apparus très tôt au cours de l'évolution et identifiés chez pratiquement toutes les espèces d'angiospermes ou des gènes uniques à l'origine de miARN spécifiques d'une espèce (ou d'un groupe d'espèces) qui sont apparus récemment (Axtell, 2008). Les gènes de la première catégorie sont généralement présents à plusieurs *loci* dans le génome et beaucoup plus fortement exprimés que ceux de la deuxième catégorie. Chez *Arabidopsis* et chez le riz, il est admis que les miARN régulent environ 1 % des gènes codant des protéines (German *et al.*, 2008), majoritairement des facteurs de transcription (Jones-Rhoades *et al.*, 2006) ; cette valeur est très faible au regard des 60 % de gènes affectés par des miARN chez les mammifères.

Les nat-siARN

La biogenèse de ces siARN comporte en général deux étapes : une phase d'initiation (nat-siARN primaires) et une phase de renforcement (nat-siARN secondaires). Ces petits ARN sont générés lors de stress ou pendant une phase précise du développement à partir de longs duplex d'ARN provenant de la transcription de gènes en orientation antisens et se chevauchant à un même locus. Généralement, un des deux gènes est exprimé de manière constitutive et l'autre en réponse à des conditions environnementales particulières. Lors de la phase initiale, les longs duplex (ARNm/LARNnc) sont découpés par DCL1 (ou DCL2) pour générer les nat-siARN primaires, présents en faible quantité, qui sont dirigés contre les transcrits du gène constitutivement exprimé. Le clivage de ces derniers permet le recrutement d'une des ARN polymérase ARN dépendantes, appelée RDR6, qui est capable de synthétiser un long ARN double-brin complémentaire à l'ARN coupé par le nat-siARN primaire. Ce long duplex sera alors pris en charge par une des quatre DCL présentes chez *Arabidopsis* et clivé à son tour en nat-siARN secondaires capables d'éteindre complètement l'action du gène constitutivement exprimé en conditions normales (Xie & Qi, 2008). Il a été démontré que ce mode de biogenèse nécessitait également l'intervention d'une ARN polymérase spécifique des plantes : l'ARN polymérase IV qui possède certaines sous-unités en commun avec l'ARN polymérase II (Huang *et al.*, 2009).

La réponse des plantes aux stress abiotiques

Un stress est défini comme un changement des conditions externes qui affecte l'homéostasie cellulaire. Si

on commence à bien connaître les différentes voies de signalisation qui sont à l'origine de la réponse de la plante aux contraintes environnementales, les récepteurs qui perçoivent la grande majorité des stress restent à découvrir. Les stress perçus par la plante induisent différentes voies de transduction de signaux qui convergent généralement vers la signalisation des hormones de stress telles que l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique, l'éthylène ou le méthyl-jasmonate. De plus, dans la plupart des cas, les stress tant biotiques qu'abiotiques entraînent la production d'espèces activées de l'oxygène, à des niveaux toxiques pour l'ensemble des macromolécules de la cellule.

A. Les longs ARNnc

Parmi les LARNnc intervenant dans la réponse aux conditions environnementales, le rôle de l'ARNnc « *Induced by Phosphate Starvation 1 (IPS1)* » est le mieux documenté chez *Arabidopsis*. Ce LARNnc de 542 nt, identifié en 2000 (Martin *et al.*, 2000) chez la plante modèle, possède de fortes homologies de séquence avec la famille de transcrits *TPS11* préalablement détectés chez la plante légumineuse *Medicago truncatula* ou chez la tomate lors de la croissance des plantes sur un milieu riche en phosphate inorganique (Pi). Chez ces trois espèces, les transcrits *IPS* disparaissent des racines dès que le milieu est carencé en Pi (Liu *et al.*, 1998 ; Burleigh & Harrison, 1999). La comparaison des séquences *IPS1* révèle, chez toutes les espèces, la présence de petites phases ouvertes de lecture (capacité codante < à 24 nt) ; par contre, aucune des homologies de séquence observées n'est comprise dans ces phases ouvertes de lecture. Ceci suggère fortement que ce n'est pas *via* leurs faibles capacités codantes que ces transcrits exercent leur fonction, si fonction il y a. En revanche, un motif de 23 nt est systématiquement retrouvé chez toutes les espèces ; il est complémentaire de la séquence d'un miARN, miR399, qui joue un rôle très important dans la signalisation systémique du Pi chez les plantes (voir paragraphe suivant). Les transcrits *IPS1* inhibent l'action du miR399, en le séquestrant de façon stable ; en effet, le miR399 est incapable de cliver le LARNnc *IPS1* car il existe un mésappariement entre miR399 et *IPS1* au site où le clivage devrait avoir lieu (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Lorsque le miR399 est séquestré, il ne peut plus intervenir sur ces cibles et tout particulièrement sur la cible *PHOSPHATE2 (PHO2)* dont l'accumulation augmente de façon importante. La protéine PHO2 (Pant *et al.*, 2008) intervient activement dans l'homéostasie du phosphate inorganique (Pi).

Lors de stress tant biotiques qu'abiotiques, aussi bien chez *Arabidopsis* que chez le riz (Ben Amor *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2012), l'expression de nombreux

longs transcrits antisens a été fréquemment observée. Ces antisens ne sont pas forcément exprimés dans tous les types cellulaires en réponse aux conditions de stress. Les duplex sens/antisens ainsi formés sont pris en charge par DCL1 pour générer des nat-siARN qui intègrent le complexe RISC pour réguler de manière post-transcriptionnelle les transcrits sens correspondants, exprimés de manière constitutive (voir le paragraphe sur les nat-siARN ci-dessus). À cela, il faut ajouter certains LARNnc intergéniques décrits par (Liu Q. *et al.*, 2012) dont les accumulations sont modulées par différents types de stress abiotiques et qui pourraient réguler en *trans* un certain nombre de gènes cibles. Il est prévisible que des résultats intéressants découleront rapidement de ce travail de défrichage publié récemment.

B. Les miARN

Dès l'identification des miARN chez les plantes, il est apparu que ces s_ARN intervenaient dans les voies de réponses aux conditions environnementales. En effet, chez le mutant *hyl1*, chez lequel la voie de biogenèse des miARN est fortement affectée, une hypersensibilité à l'ABA, l'hormone de stress par excellence, a été observée (Lu & Fedoroff, 2000). Récemment, un autre acteur de la biogenèse des miARN, SICKLE, une glycoprotéine riche en hydroxyproline de fonction inconnue, a confirmé cette implication générale des miARN dans la réponse des plantes aux stress (Zhan *et al.*, 2012).

Chez toutes les espèces examinées, la grande majorité des miARN conservés présentent des modifications d'accumulation lorsque les plantes sont soumises à des stress biotiques ou abiotiques. Ces variations d'expression des gènes ou de la stabilité des s_ARN sont parfois différentes, pour un miARN donné, d'une espèce végétale à l'autre (Khraiwesh *et al.*, 2012; Sunkar *et al.*, 2012). Le mode d'action des miARN passe par le clivage de l'ARNm cible ou de l'inhibition de la traduction de celui-ci. La démonstration du rôle direct des miARN dans la physiologie cellulaire lors de la réponse aux stress environnementaux nécessite donc de démontrer que la ou les cibles sont bien régulées par le miARN et de connaître la fonction de ces dernières. En prenant en compte ces critères, le rôle des miARN a été décrypté dans peu de cas en ce qui concerne la réponse aux stress. Nous nous limiterons ici à la description des deux exemples les mieux documentés.

Chez *Arabidopsis*, le miR398 est le premier miARN pour lequel un rôle dans l'homéostasie cellulaire a été découvert. Le mode d'action de ce miARN conservé a ensuite été retrouvé chez toutes les espèces étudiées. Lors de stress, l'accumulation du miR398

est fortement réduite dans tous les organes de la plante (Khraiwesh *et al.*, 2012). Le miR398 reconnaît les transcrits de quatre gènes cibles : deux Cu/Zn superoxyde dismutases (*CSD1* et *CSD2*), une cytochrome oxydase (*COX5-b1*) et une chaperone (*CCS1*). Le clivage de toutes ces cibles par le miARN a été confirmé par des expériences de RACE-PCR lors de stress. Chez les plantes, les superoxydes dismutases (SOD), les catalases, les peroxydases sont des enzymes clés de la détoxification des espèces activées de l'oxygène. La diminution de l'accumulation du miR398, consécutive à l'application d'un stress, a pour conséquence d'augmenter de manière importante les protéines cibles, entre autres les SOD et, par là-même, de mettre en œuvre une réponse cellulaire adaptée aux stress oxydatifs subis par la plante. L'action du couple miR398/SOD sur la composante oxydative des stress explique sans doute pourquoi l'accumulation de ce microARN est réduite lors d'un grand nombre de stress abiotiques différents. L'action protectrice, vis-à-vis du stress, de l'augmentation d'une des deux protéines SOD a été par la suite démontrée chez des plantes sur-exprimant une version de *CSD2* résistante au clivage par le miR398 (Sunkar *et al.*, 2006). Les formes résistantes aux miARN sont obtenues par délétion (région 3'UTR des gènes) ou par modifications (les codons initiaux sont transformés en codons synonymes dans les phases ouvertes de lecture) du site de reconnaissance du miARN dans les constructions utilisées pour la transgénèse. De ce fait, les transcrits générés à partir de ces constructions ne peuvent plus être régulés par le miARN. Le miR398 ne se limite pas à réguler les stress oxydatifs, il fait également partie du réseau qui contrôle la concentration cellulaire de l'ion cuivrique Cu^{2+} . Une augmentation de l'accumulation de miR398 entraîne indubitablement une réduction importante des protéines Cu-SOD et libère des ions Cu^{2+} qui sont alors disponibles pour intervenir dans d'autres processus cellulaires (Yamasaki *et al.*, 2007).

Le miR399 a été très étudié chez *Arabidopsis* dans la mesure où il intervient dans le métabolisme du phosphate (Pi), un élément minéral essentiel à la croissance des plantes. Chez la plante modèle, la régulation de l'expression des six gènes miR399 et de LARNnc *IPS1* (voir paragraphe ci-dessus) pourrait se faire entre autres *via* un motif P1BS présent dans la séquence promotrice de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme du phosphate. Ce motif est reconnu par des facteurs de transcription de la famille R2R3 MYB tels que PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) ou PHR1-LIKE1 qui sont essentiels à la réponse de la plante aux carences en Pi (Bustos *et al.*, 2010). Plusieurs cibles de miR399 ont été identifiées, la plus importante correspondant aux ARNm codant la protéine PHO2. Le gène *PHO2* code une des enzymes

de conjugaison du système ubiquitine-protéasome qui régule l'adressage des protéines marquées par de petits polymères d'ubiquitine vers la dégradation par le protéasome (Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006). Chez *Arabidopsis*, la surexpression du miR399, qui a pour conséquence une réduction, voire une disparition de la protéine PHO2, entraîne une forte accumulation de Pi dans les parties aériennes de la plante. Lorsque le mutant *pho2* ou des plantes transgéniques sur-exprimant miR399 (qui sont identiques aux mutants *pho2* d'un point de vue phénotypique) sont cultivés dans des conditions normales vis-à-vis de la concentration en Pi, une augmentation de l'absorption du Pi et de la translocation de celui-ci vers la partie caulinale se traduit par une suraccumulation de l'élément minéral dans la partie aérienne de la plante qui s'avère toxique (Fujii *et al.*, 2005). Cette expérience confirme, d'une part, que les transcrits *PHO2* sont bien une des cibles du miR399 et, d'autre part, que la protéine PHO2 est un élément clef de la régulation de l'homéostasie cellulaire du Pi. Lors de carence en Pi, une forte accumulation du miR399 est très vite observée dans la partie caulinale suivie de la disparition de *PHO2* dans les racines et de l'activation de l'absorption de Pi (Fujii *et al.*, 2005). *PHO2* et le miR399 ont été observés dans les tissus vasculaires (Aung *et al.*, 2006). Chez *Arabidopsis*, lors de carences en Pi, des expériences de greffes réciproques entre des racines et des parties aériennes de plantes sauvages et de plantes sur-exprimant le miR399 ont clairement démontré un mouvement systémique basipète (de la partie caulinale vers les racines) du miR399. Ce mouvement de miARN est considéré comme une des premières étapes de la réponse de la plante à un déficit en Pi; il est à l'origine de la répression des transcrits *PHO2* dans les racines (Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008). Ce signal systémique permet, d'une part, de communiquer aux racines le statut en Pi des feuilles et, d'autre part, d'activer l'absorption de l'élément minéral au niveau des racines.

C. Les nat-siARN

Les premiers nat-siARN ont été découverts chez *Arabidopsis* lors d'un traitement salin. Les nat-siARN générés étaient dirigés contre les transcrits d'un gène du catabolisme de la proline, un osmolyte puissant impliqué dans la tolérance aux stress hydriques chez de nombreuses espèces végétales (Borsani *et al.*, 2005). Par la suite, un mécanisme similaire a été retrouvé lors d'une infection bactérienne; des nat-siARN dirigés contre les transcrits d'un régulateur négatif de l'immunité de la plante permettent d'augmenter considérablement la résistance à l'infection (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). À l'heure actuelle, ce mécanisme a été généralisé à de nombreuses espèces.

Un article publié récemment dans la revue *Genome Biology* (Zhang *et al.*, 2012) recense de nombreux nat-siARN induits lors de stress biotiques et abiotiques à partir des 1439 et 765 paires de gènes antisens répertoriées respectivement chez *Arabidopsis* et chez le riz.

Nous n'avons pas abordé ici la biogenèse et le rôle des siARN qui interviennent dans les modifications de la structure et/ou de la fonction de la chromatine. Ces siARN interagissent fréquemment, au niveau de l'ADN, avec du LARNnc généré par l'ARN Pol IV ou l'ARN Pol V qui sont spécifiques des plantes et conduiraient à des modifications épigénétiques (Wierzbiński, 2012).

Conclusion

Les LARNnc et les sARNnc sont des acteurs importants de la réponse des plantes aux conditions de l'environnement. Cependant, les informations fonctionnelles disponibles actuellement sont relativement limitées. Nous avons vu que la « transcriptomique » a permis de défricher le terrain. L'accumulation de nombreux miARN et nat-siARN est modulée lors de stress tant biotiques qu'abiotiques; malheureusement la fonction de leurs cibles n'a pour l'instant été déterminée que dans de rares cas. Les contraintes environnementales réduisent considérablement les rendements des cultures. Du point de vue de l'agronomie, il est donc important de comprendre et de maîtriser les mécanismes moléculaires qui régissent la physiologie d'adaptation des plantes aux stress, et ce sera, à n'en pas douter, un axe majeur pour les recherches dans ce domaine.

Chez les animaux, les LARNnc ont fréquemment révélé une fonction d'échafaudage entre différentes formes de macromolécules (ARN, ADN et protéines), qui permet une implication de ces molécules dans la régulation de la plupart des mécanismes cellulaires fondamentaux tels que la transcription, l'épissage, la structure de la chromatine ou la synthèse des protéines. Il est prévisible que des fonctions similaires, tout comme des fonctions de guide, devaient être découvertes à court terme pour certains LARNnc chez les végétaux. De plus, à l'heure actuelle, les mécanismes qui régulent l'expression de ces LARNnc demeurent inconnus tant chez les animaux que chez les plantes. Il est probable que ceux-ci devraient être décryptés dans les années à venir.

Références

Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Huang Y.T., Su C.L., Chiou T.J., *pho2*, a phosphate over accumulator, is caused by

- a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol*, 2006, 141, 1000–1011.
- Axtell M.J., Bowman J.L., Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci*, 2008, 13, 343–349.
- Bardou F., Merchan F., Ariel F., Crespi M., Dual RNAs in plants. *Biochimie*, 2011, 11, 1950–1954.
- Bari R., Datt Pant B., Stitt M., Scheible W.R., PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 2006, 141, 988–999.
- Ben Amor B., Wirth S., Merchan F., Laporte P., d'Aubenton-Carafa Y., Hirsch J., Maizel A., Mallory A., Lucas A., Deragon J.M., Vaucheret H., Thermes C., Crespi M., Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Res*, 2009, 19, 57–69.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., Zhu J.K., Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123, 1279–1291.
- Burleigh S.H., Harrison M.J., The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol*, 1999, 119, 241–248.
- Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M.I., Rubio V., Pérez-Pérez J., Solano R., Leyva A., Paz-Ares J., A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2010, 6, e1001102.
- Clark M.B., Mattick J.S., Long noncoding RNAs. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22, 366–376.
- Franco-Zorrilla J.M., Valli A., Todesco M., Mateos I., Puga M.I., Rubio-Somoza I., Leyva A., Weigel D., García J.A., Paz-Ares J., Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 2007, 39, 1033–1037.
- Fujii H., Chiou T.J., Lin S.I., Aung K., Zhu J.K., A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15, 2038–2043.
- German M.A., Pillay M., Jeong D.H., Hetawal A., Luo S., Janardhanan P., Kannan V., Rymarquis L.A., Nobuta K., German R., De Paoli E., Lu C., Schroth G., Meyers B.C., Green P.J., Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 941–946.
- Heo J.B., Sung S., Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*, 2010, 331, 76–79.
- Hirsch J., Lefort V., Vankersschaver M., Boualem A., Lucas A., Thermes C., d'Aubenton-Carafa Y., Crespi M., Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in *Arabidopsis*, including the MIR162a-derived transcripts. *Plant Physiol*, 2006, 140, 1192–1204.
- Huang L., Jones A.M., Searle I., Patel K., Vogler H., Hubner N.C., Baulcombe D.C., An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16, 91–93.
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B., MicroRNAs and their regulatory role in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57, 19–53.
- Katiyar-Agarwal S., Morgan R., Dahlbeck D., Borsani O., Villegas A.Jr., Zhu J.K., Staskawicz B.J., Jin H., A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 18002–18007.
- Kim Y.J., Zheng B., Yu Y., Won S.Y., Mo B., Chen X., The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 2011, 30, 814–822.
- Khraiweh B., Zhu J.K., Zhu J., Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819, 137–148.
- Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Ratsch G., Weigel D., Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 8795–8800.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J., Chen X., Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15, 1501–1507.
- Li Y.F., Zheng Y., Addo-Quaye C., Zhang L., Saini A., Jagadeeswaran G., Axtell M.J., Zhang W., Sunkar R., Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant J*, 2010, 62, 742–759.
- Lin S.I., Chiang S.F., Lin W.Y., Chen J.W., Tseng C.Y., Wu P.C., Chiou T.J., Regulatory network of micro-RNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol*, 2008, 147, 732–746.
- Liu C., Muchhal U.S., Uthappa M., Kononowicz A.K., Raghobama K.G., Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol*, 1998, 116, 91–99.
- Liu J., Jung C., Xu J., Wang H., Deng S., Bernad L., Arenas-Huertero C., Chua N.H., Genome-Wide Analysis Uncovers Regulation of Long Intergenic Noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, disponible en ligne.
- Liu Q., Shi L., Fang Y., Dicing bodies. *Plant Physiol*, 2012, 158, 61–66.
- Lu C., Fedoroff N., A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell*, 2000, 12, 2351–2366.
- Magistri M., Faghihi M.A., St Laurent G., Wahlestedt C., Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts. *Trends Genet*, 2012, 28, 399–396.
- Martín A.C., del Pozo J.C., Iglesias J., Rubio V., Solano R., de La Peña A., Leyva A., Paz-Ares J., Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation

- responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2000, 24, 559–567.
- Mattick J.S., Rocking the foundations of molecular genetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 16400–16401.
- Pant B.D., Buhtz A., Kehr J., Scheible W.R., Micro-RNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 2008, 53, 731–738.
- Sunkar R., Kapoor A., Zhu J.K., Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 2006, 18, 2051–2065.
- Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G., Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci*, 2012, 17, 196–203.
- Swiezewski S., Liu F., Magusin A., Dean C., Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 2009, 462, 799–802.
- Voinnet O., Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136, 669–687.
- Wierzbicki A.T., The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 5, 517–522.
- Xie Z., Qi X., Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779, 720–724.
- Yamasaki H., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Kobayashi Y., Shikanai T., Pilon M., Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2007, 282, 16369–16378.
- Zhan X., Wang B., Li H., Liu R., Kalia R.K., Zhu J.K., Chinnusamy V., *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 18198–1820.
- Zhang X., Xia J., Lii E., Barrera-Figueroa B.E., Zhou X., Gao S., Lu L., Niu D., Chen Z., Leung C., Wong T., Zhang H., Guo J., Li Y., Liu R., Liang W., Zhu J.K., Zhang W., Jin H., Genome-wide analysis of plant natural siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol*, 2012, 13, R20.