

Annie Lamouroux (1955 – 2018)

Annie Lamouroux nous a quittés le 25 Septembre 2018 après s'être battue contre un cancer pendant de longs mois. Elle avait pris sa retraite en février 2018 mais tout le laboratoire comptait encore sur elle, ses visites, ses conseils sur tous les résultats qu'elle nous a laissés et bien plus encore. Son absence définitive nous a tous anéantis, et nous regretterons pour toujours son infinie douceur, sa bonté, son attention et sa capacité d'écoute vis à vis de tous ceux qui l'ont cotoyée au laboratoire.

Afin de lui rendre hommage et de garder la mémoire de tous ses apports scientifiques et humains au monde de la recherche, et plus particulièrement en génétique, ce texte présente de façon chronologique les trois grandes étapes de sa vie de chercheuse. Les premières années dans le laboratoire de P. Slonimski sur la levure ont été racontées par Eric Petrochilo, (devenu son mari par la suite), qui se trouvait au même endroit au même moment. Jacques Mallet a ensuite rédigé la seconde partie de sa carrière chez les mammifères qui s'est déroulée dans son laboratoire de Neurobiologie de 1981 à 1996. François Rouyer décrit enfin dans la troisième partie tout ce qu'elle a pu apporter au rythme circadien de la drosophile depuis 1997 jusqu'à sa retraite.

J'ai personnellement eu le bonheur de travailler avec Annie dès mes débuts dans la recherche dans le laboratoire de J. Mallet. J'ai eu la chance d'apprendre ce métier avec elle, avant de la retrouver quelques années plus tard dans le laboratoire de F. Rouyer. Elle a ainsi pu inculquer à tous les étudiants qu'elle a formés au cours de sa carrière toute la rigueur et la curiosité nécessaires, ne jamais faire sans tenter de comprendre. Notre amitié a commencé dès notre rencontre, et nous ne nous sommes jamais quittés depuis.

Nous espérons que ces quelques pages traduiront également aux lecteurs tout ce qu'Annie a pu offrir à tous ceux qui ont eu la joie de travailler avec elle.

Brigitte Grima



Première partie : Génétique mitochondriale de la levure

La carrière scientifique d'Annie Lamouroux débuta à Gif sur Yvette dans le laboratoire de Piotr Slonimski en Octobre 1977, lorsqu'elle entreprit une thèse de troisième cycle sous la direction de Patrick Pajot. Fraîchement émoulue du DEA de Génétique, qu'elle avait obtenu avec mention Bien, elle avait choisi d'étudier par des méthodes génétiques, le fonctionnement des gènes mitochondriaux impliqués dans la synthèse des cytochromes *b* et *a* de la voie respiratoire chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La levure est aérobie facultative. La perte de la capacité respiratoire n'est pas létale, d'où la possibilité d'obtenir chez cet organisme des mutations ponctuelles dans l'ADN mitochondrial qui inactivent les différents polypeptides que ce génome contribue à la voie respiratoire, tout

en conservant intacte la capacité de synthèse protéique de l'organite. Lorsqu' Annie commença sa thèse, un grand nombre de ces mutants, appelés [*mit-*], avaient été obtenus dans le laboratoire de Piotr Slonimski ainsi que dans d'autres laboratoires, c'est sur leur analyse qu'a porté son travail de thèse.

Dans l'équipe de Slonimski différents groupes avaient entrepris d'étudier de façon moléculaire et génétique les mutants [*mit-*] affectant la respiration. Ces travaux avaient permis d'identifier sept régions du génome mitochondrial intervenant dans la synthèse de peptides impliqués dans la chaîne respiratoire. Annie s'est investie dans l'étude de la région *box* contrôlant la synthèse de la seule sous-unité mitochondriale de l'apocytochrome *b*.

Plus d'une centaine de mutants [*mit-*] dépourvus de cette fonction avaient été étudiés génétiquement par recombinaison et cartographiés plus finement par croisement avec une collection ordonnée de mutants [*rho-*] partiellement délétés pour cette région. Ce travail avait permis d'identifier dix groupes de mutants (loci) qui ont été ordonnés de la façon suivante : *box 6 - box 2 - box 7 - box 9 - box 1 - box 10 - box 8 - box 3 - box 4/5*. L'analyse du cytochrome *b* des mutants de ces loci, sur gel d'acrylamide, avait montré que chez les mutants des loci 4/5, 1 et 6, la bande normale de cette protéine avait disparu pour faire place à une bande d'autant plus petite que le locus auquel appartenait le mutant analysé était plus proche de l'extrémité *box 4/5*. Cela faisait penser à une région transcrite de droite à gauche dans laquelle des mutants *non-sens* en *box 4/5*, *box 1*, ou *box 6* interrompaient prématurément la traduction. Le profil sur gel des mutants appartenant aux autres loci *box* faisaient apparaître plusieurs bandes dont certaines plus grandes que celle de l'apocytochrome *b* normal.

C'est sur ces bases qu' Annie commença l'étude de la complémentation des mutants *box*. La principale difficulté de l'étude réside dans le fait qu'elle porte sur une population transitoire, les zygotes, qui contiennent plusieurs dizaines de mitochondries mais n'en transmettent qu'un petit nombre à chaque descendant, or la complémentation requiert la présence des deux génotypes dans la même cellule. De plus la recombinaison entre les deux génomes mitochondriaux mutés produira des génomes sauvages qui permettront à terme à ces cellules de respirer. Il était donc impératif d'effectuer, pour chaque croisement, une étude cinétique de la respiration d'une population de zygotes depuis le moment de leur obtention et sur une période allant parfois, selon le type d'expérience, jusqu'à 19 heures.

Par ailleurs l'étude de souches double mutantes *box x box y* (où *x* et *y* se réfèrent à l'un des dix loci identifiés précédemment) pouvait fournir des arguments qualitatifs sur le fonctionnement du gène *box* et éclairer les modèles qui émergeaient des travaux antérieurs, Annie a donc construit un grand nombre de doubles mutants, dont les phénotypes moléculaires ont été caractérisés par Maurice Claisse et Athanase Spyridakis, qu'elle a utilisés pour effectuer des tests génétiques. Les résultats des tests de complémentation réalisés avec 63 mutants répartis dans les dix loci, sur un total de 140 disponibles, identifient quatre groupes de complémentation.

Le premier et le plus important comprend tous les mutants étudiés qui appartiennent aux loci *box 4/5*, *box 8*, *box 1*, *box 9*, *box 2* et *box 6*. Aucune complémentation n'est observée entre ces différents mutants. Ce groupe réunit les trois loci soupçonnés de coder l'apoprotéine *b* : *box 4/5*, *box 1* et *box 6*, mais aussi les mutants des loci *box 8*, *box 9* et *box 2* qui ne semblent pas se trouver dans la région codante de la protéine. Les mutants des trois autres loci : *box 3*, *box 10* et *box 7* complémentent tous les autres mutants, sauf ceux qui appartiennent à leur propre locus. Chacun de ces trois loci représente donc un groupe de complémentation différent. Ces trois groupes qui se complémentent entre eux, se situent, sur la carte du gène *box*, entre les loci que les données moléculaires désignent comme constituant les régions codantes de l'apoprotéine *b*. Ils sont introniques selon la nomenclature introduite par W. Gilbert en 1978, tandis que les loci *box 4/5*, *box 1* et *box 6* sont les exons du gène *box*. Quant aux loci *box 8*, *box 9* et *box 2*, on peut

penser qu'il s'agit de mutants de la jonction intron-exon, ce qui est étayé par la liaison génétique très forte de certains d'entre eux à des mutants de l'exon le plus proche. Au moment où Annie soutient sa thèse, l'existence des introns est bien documentée, mais leur analyse dans d'autres laboratoires est purement moléculaire et n'a livré jusqu'alors aucune indication quant à leur éventuelle fonction. Le travail d'Annie est la première étude fonctionnelle de ces objets et elle aboutit à des conclusions totalement inattendues : les introns peuvent intervenir dans l'expression des gènes dans lesquelles ils se trouvent. De plus ils interviennent en *trans* donc par l'intermédiaire d'un produit diffusible.

Dans la conclusion de son travail, Annie envisage expressément l'hypothèse que ce facteur diffusible soit une protéine, qui deviendra peu de temps après la *maturase* et contribuera fortement à la réputation du laboratoire, mais elle l'écarte ensuite en faveur d'une interaction au niveau des ARN pré-messagers. Ce travail, qui ne fut jamais publié, connu néanmoins un grand retentissement lors d'une présentation qu'elle fit à Cold Spring Harbor en juillet 1979 et sa thèse a beaucoup circulé dans la petite communauté internationale des mitochondrialistes. Annie était une belle jeune femme avec un beau regard souvent mélancolique, c'était surtout une personne attachante, posée, simple et sans détours, réservée mais jamais hautaine, et toujours prête à discuter sciences bien sûr, mais aussi politique, littérature, cinéma, ou peinture. Des années après son passage au laboratoire, elle m'a invité un soir à dîner chez elle et je n'en suis jamais reparti. Bien plus tard encore nous avons eu trois enfants et pour finir nous nous sommes mariés. Pendant toutes ces années, Annie a poursuivi sa carrière scientifique brillamment. Elle a pris sa retraite le 1^{er} Février 2018, le 2 Février elle a été diagnostiquée d'un cancer du poumon très avancé, elle est morte le 25 Septembre après huit mois de soins pénibles qu'elle a endurés avec fortitude sans jamais se plaindre ni s'apitoyer.

Eric Petrochilo



Deuxième partie : Biologie moléculaire de la neurotransmission

Certaines rencontres se font au sommet, d'autres... en pyjama ! C'est dans cette tenue vestimentaire, dans le couloir d'un appartement alpin qu'Annie et moi fîmes connaissance un beau matin de l'année 1980. Nous participions l'un et l'autre à un congrès de la DGRST qui a joué dans ces années un rôle majeur dans la formation des jeunes chercheurs. La décennie précédente avait vu l'irruption des puissantes techniques de manipulation et de clonage de l'ADN qui ont véritablement fait entrer la biologie dans une ère nouvelle, celle de la biologie moléculaire.

Annie terminait sa thèse sur la génétique de la levure, dans le très renommé Centre de génétique moléculaire (CNRS) de Piotr Slonimski à Gif-sur-Yvette. De mon côté, désireux de voler de mes propres ailes, je venais de quitter l'Institut Pasteur avec en tête le désir d'appliquer la biologie et la génétique moléculaires à la neurologie. J'ai fait part à Annie de ce projet très novateur et lui ai exposé les progrès potentiels attendus sur le fonctionnement de notre cerveau. Tellement convaincu de la pertinence de ce projet, j'ai dû être convaincant, Annie, non sans

courage, a accepté aussitôt de participer à cette aventure très stimulante. C'est ainsi qu'elle est venue me rejoindre à Orsay. J'ai constitué ma propre équipe de recherche, rapidement étoffée par l'arrivée d'autres personnes aux compétences complémentaires. Notre groupe s'était fixé comme premier objectif d'analyser au niveau moléculaire la régulation de l'expression des neurotransmetteurs. Au terme d'une période intense de travaux accomplis avec le sentiment enthousiasmant de vivre une aventure et grâce à la synergie des compétences, notre équipe a réalisé en 1982 le clonage du gène codant la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme qui joue un rôle clé dans la synthèse des catécholamines. Ce fut le premier gène cloné dans le système nerveux. Publié dans PNAS avec pour premier auteur Annie, ce travail pionnier a constitué une première qui a valu à l'équipe une reconnaissance internationale.

Avec ce travail pionnier, l'équipe s'est développée, a accueilli de nombreux étudiants, Annie a su leur dispenser ses connaissances, ses compétences et les guider, ainsi d'autres gènes des enzymes de synthèse de plusieurs neurotransmetteurs ont été clonés.

Annie a été une scientifique de grande qualité qui a fait preuve pendant nos années de collaboration d'une grande rigueur, d'un esprit aiguisé pour la recherche, d'une volonté sans faille d'aboutir. Elle a de surcroît fortement contribué à la création d'un esprit de groupe au sein de mon laboratoire. Annie n'est plus là mais cet esprit de groupe perdure et il constitue à mes yeux un atout essentiel pour avancer sur le chemin de la découverte.

Je souhaite, au-delà de ses indéniables qualités de scientifique, rendre hommage aux qualités humaines d'Annie reconnues par tous, une femme douce et en même temps passionnée, indépendante et en même temps chaleureuse qui souvent nous faisait partager les joies que lui procuraient tant la lecture que la musique.

Jacques Mallet



Troisième partie : Neurogénétique de l'horloge circadienne

Annie Lamouroux est arrivée au laboratoire en 1997. Notre équipe Génétique Moléculaire des Rythmes Circadiens s'était installée en 1996 à l'Institut Alfred Fessard (maintenant l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay) avec le soutien du programme ATIP du CNRS. L'étude de l'horloge circadienne de la drosophile mariait les approches génétiques riches de cet organisme avec la neurobiologie du comportement, une combinaison pleine de promesses qui a valu récemment le prix Nobel de Physiologie et Médecine à J. Hall, M. Rosbash et M. Young aux Etats-Unis. Pour Annie, c'était aussi faire un lien entre les deux grandes étapes précédentes de son parcours scientifique.

Un des projets du laboratoire était d'identifier un gène dont le profil d'expression dans le cerveau était restreint à quelques neurones, qui ressemblaient beaucoup aux neurones d'horloge appelés LNV (*ventral Lateral Neurons*), identifiés en immuno-marquage par des anticorps dirigés contre le neuropeptide PDF (*Pigment-Dispersing Factor*). Le profil d'expression était renseigné par l'insertion d'un gène rapporteur de type Gal4. Cette insertion, *Gal1118*, faisait partie d'une collection *enhancer-trap* générée par l'équipe voisine de Thomas Prémat, pour

identifier des gènes exprimés dans des structures du cerveau impliquées dans la mémoire. La similitude du profil d'expression de *Gal1118* avec celui du PDF nous excitait beaucoup. PDF ou pas, un gène exprimé spécifiquement dans une vingtaine de neurones d'horloge devait être intéressant et Annie s'attela avec enthousiasme à son identification. Le principe paraissait simple, il fallait identifier le gène de la région dont l'expression ressemblait à celle de *Gal1118*. La mise en œuvre s'avéra plus compliquée, à une époque où la séquence du génome n'était pas encore connue. La publication de la séquence du génome de drosophile en 2000 nous fit beaucoup progresser, mais deux gènes avaient été prédits dans la région et les analyses transcriptionnelles d'Annie disaient qu'ils ne faisaient qu'un, à la structure complexe, ce qui s'avéra exact. Ce grand gène contenait 12 exons et Annie identifia différents transcrits produits par épissage alternatif, le plus long codant pour une protéine de 2700 acides aminés. Pour couronner le tout, le gène contenait dans son premier intron un autre petit gène avec lequel il partageait un premier exon non-codant. Avec une étudiante en thèse, Angélique Lamaze, Annie mit en évidence que l'ubiquitine ligase à domaine HECT codée par le grand gène était impliquée dans le comportement circadien via le contrôle des quantités de deux protéines majeures de l'oscillateur circadien, CLOCK et PERIOD. Le gène fut nommé *circadian trip* (*ctrip*) à cause de sa similitude de séquence avec le gène mammifère *Trip12*. Le gène *ctrip* renferme encore beaucoup de mystères et jusqu'à son départ à la retraite, alors qu'elle avait focalisé le plus gros de ses efforts sur d'autres projets, Annie continua à creuser le sillon *ctrip*. Elle mit ainsi en évidence un phénotype développemental de la délétion d'un exon du gène, qui reste aussi intéressante qu'inexpliquée à ce jour.

Annie contribua de façon importante à plusieurs autres projets du laboratoire. En 1997, elle avait rejoint l'équipe avec Brigitte Grima, avec laquelle elle était liée d'une profonde amitié depuis leur rencontre dans le laboratoire de J. Mallet. Tout en bataillant contre *ctrip*, Annie apporta une contribution clé au projet de Brigitte qui identifia l'ubiquitine ligase SLMB comme un acteur majeur de la régulation des oscillations des protéines PERIOD et TIMELESS. Annie mit au point les techniques de PCR quantitatives qui s'avèrent déterminantes pour l'étude de l'expression temporelle des gènes d'horloge au laboratoire. Elle contribua ainsi à la caractérisation fonctionnelle de plusieurs nouveaux composants de l'oscillateur circadien tels que le facteur de transcription CLOCKWORK ORANGE, l'ubiquitine ligase CULLIN-3 ou la sous-unité STRIP du complexe phosphatase STRIPAK. Dans tous ses projets Annie souhaitait aller au bout des choses, sans trop se préoccuper du temps, et il en allait de même pour les discussions sur tous les sujets. Observer, réfléchir, discuter sans limites et sans tabous de toute chose, pour en extraire la substantifique moelle. Une certaine façon de vivre en quelque sorte.

François Rouyer