



Mardi 10 février 2015 à 14h00
Académie des sciences – Grande salle des séances
23, quai de Conti – 75006 Paris

« Journée ARN » en hommage à Marianne GRUNBERG-MANAGO

Marianne GRUNBERG-MANAGO

Marianne Grunberg-Manago, remarquable biochimiste et personnalité hors du commun, a découvert la polynucléotide phosphorylase (PNPase), une enzyme qui synthétise des polyribonucléotides, éléments constitutifs de l'ARN tel l'ARN polyU. Cette enzyme est à l'origine de la compréhension du code génétique. En effet, Marshall Nirenberg et Heinrich Matthaei montrent en 1961 que l'ARN polyU synthétisé par l'enzyme dirige à son tour la synthèse d'un fragment de protéine, l'oligopeptide polyphénylalanine. La passion de Marianne Grunberg-Manago pour la molécule d'ARN n'a cessé de s'amplifier et l'un des objectifs de cette journée est d'illustrer la place croissante de l'ARN dans tous les domaines de la biologie grâce à quelques exemples aussi éloignés que la virulence bactérienne ou l'empreinte parentale chez l'homme.

14:00 Introduction

Eric WESTHOF, Académie des sciences, professeur à l'université de Strasbourg, Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, Strasbourg

14:05 L'œuvre de Marianne GRUNBERG-MANAGO

Mathias SPRINGER, Académie des sciences, directeur de recherche au CNRS, Institut de biologie physico-chimique, Paris

14:25 Nouveaux concepts en régulation ARN-dépendante chez les bactéries

Pascale COSSART, Académie des sciences, professeur à l'Institut Pasteur, Unité des interactions bactéries-cellules, Inserm U604, INRA USC2020, Paris

14:45 ARN et hérédité non mendélienne chez la paramécie

Eric MEYER, directeur de recherche au CNRS, Institut de biologie de l'École normale supérieure, Paris

15:05 CRISPR/Cas9 : une révolution dans le génie génétique

Emmanuelle CHARPENTIER, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig Hannover Medical School Allemagne. Lauréate du Prix Jean-Pierre Lecocq 2014 de l'Académie des sciences et du prix Breakthrough 2015 in Life Sciences



15:25 Bioinformatique de l'ARN

Christine GASPIN, *directrice de recherche, Unité de Mathématiques et Informatique Appliquées, Institut national de la recherche agronomique, Toulouse*

15:45 Les multiples fonctions des ARN bactériens: communication, adaptation, défense et virulence

Pascale ROMBY, *directrice de recherche au CNRS, Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, Strasbourg*

16:05 Biogenèse et fonction des ARN dont les gènes sont régulés par l'empreinte génomique parentale

Jérôme CAVAILLÉ, *directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de biologie moléculaire des eucaryotes, CNRS/Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse*

16:30 Conclusion

François GROS, *Académie des sciences, professeur honoraire au Collège de France et à l'Institut Pasteur*



L'œuvre de Marianne GRUNBERG-MANAGO

Mathias SPRINGER

Marianne Grunberg-Manago restera une figure exceptionnelle tant du point de vue scientifique que par les nombreuses responsabilités nationales et internationales qu'elle assumait au cours de sa carrière. Elle découvrit la polynucléotide phosphorylase, l'enzyme qui ouvrit la porte à ce qui restera sans doute la plus grande avancée de la biologie du 20^{ème} siècle: le déchiffrement du code génétique. Elle fut aussi la première femme portée à la présidence de l'Académie des Sciences (1995-1996).

Marianne Grunberg-Manago, termine ses études supérieures de lettres et de sciences naturelles à l'Université de Paris, en 1943. Elle rejoint alors l'Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC) et entre au CNRS en 1945. Elle restera toujours fidèle à ces deux institutions. Elle soutient sa thèse en 1947 et part en 1953, avec une bourse Fulbright, à l'Université d'Urbana (Illinois, USA) puis obtient une bourse de la New York University, lui permettant de rejoindre le laboratoire de Severo Ochoa en 1954. Elle y découvre la polynucléotide phosphorylase (PNPase), permettant, pour la première fois, la synthèse de polyribonucléotides. Quatre ans plus tard, en 1959, Severo Ochoa et Arthur Kornberg reçoivent le prix Nobel « pour leur découverte des mécanismes de la synthèse biologique des acides ribo- et déoxyribonucléiques ».

Marianne Grunberg-Manago revient à l'IBPC en 1956 où elle étudie les propriétés biochimiques et physico-chimiques des polynucléotides. L'importance fondamentale de la PNPase éclata en plein jour en 1961 avec la découverte de Marshall Nirenberg et Heinrich Matthaei montrant que l'ajout du polyU (polynucléotide synthétisé à l'aide de la PNPase) à un système acellulaire de la bactérie *Escherichia coli* dirigeait la synthèse de polyphénylalanine. La course au déchiffrement du code génétique venait d'être lancée; elle allait durer cinq ans. En 1962, elle publie un article qui montre qu'un poly(A,C) code les acides aminés thréonine et asparagine, indiquant, contrairement à l'idée admise à cette époque, qu'il existait des codons sans U. L'arrivée de François Gros à l'IBPC en 1963 renforcera le pôle traduction du laboratoire de Marianne Grunberg-Manago. Elle étudiera les composants et les différentes étapes de la traduction chez les bactéries pour finalement s'intéresser, à la fin des années 70, à la régulation de l'expression génétique. L'autre orientation, l'étude de la structure et de la fonction de la PNPase, l'a amenée à se pencher sur le rôle biologique de la PNPase qui, en fait, est une enzyme de dégradation plutôt que de synthèse des polynucléotides *in vivo*. Cette dernière propriété l'a conduite à s'intéresser, à la fin des années 80, à la dégradation des ARN chez les bactéries modèles *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, sujet qu'elle a développé avant de tomber gravement malade le 18 mars 2000.

Marianne Grunberg-Manago n'était pas seulement une scientifique hors pair mais aussi une personne très attachante. Il était impossible à quiconque l'ayant approchée de ne pas rester marqué par son rayonnement. Sa forte personnalité lui conférait un don très particulier pour rassembler les compétences de ses collègues et la qualité rare de savoir gérer leurs conflits, aptitudes essentielles dans le monde de la science.



Nouveaux concepts en régulation ARN-dépendante chez les bactéries

Pascale COSSART

Dans le célèbre modèle de l'opéron publié par Jacob et Monod, en 1961 le répresseur était un ARN qui agissait sur l'ADN ou sur l'ARN. Comme le répresseur de l'opéron lactose s'est trouvé être une protéine agissant sur l'ADN, on a longtemps pensé que les répresseurs ainsi que les activateurs ne pouvaient être que des protéines.

Cependant, les technologies récentes ont révélé que les génomes bactériens comme ceux des eucaryotes codent pour un grand nombre d'ARNs régulateurs « non messagers » c'est à dire des ARNs qui ne codent pas pour des protéines. Ceux-ci peuvent interagir avec les ARNs messagers et inhiber ou activer l'expression des gènes, en contrôlant la synthèse des protéines.

Les études de transcriptomes bactériens ont aussi révélé la présence d'un grand nombre d'ARNs « anti-sens » qui ont une action négative sur l'expression des gènes situés sur le brin d'ADN opposé. Certains anti-sens assez longs peuvent avoir deux fonctions : ils peuvent agir comme anti-sens pour un ou plusieurs gènes et être ARN messenger pour des gènes situés en orientation opposée sur le génome. Souvent ces gènes orientés de façon divergente codent pour des protéines aux fonctions opposées. Nous avons appelé ces loci complexes des « excludons ».

La partie 5' non traduite des ARN messagers peut être le siège de nombreuses régulations. Nous avons montré il y a de nombreuses années que les gènes de virulence de *Listeria* sont régulés par un thermosenseur, une structure qui selon la température permet ou non l'expression d'un activateur. Il a été mis en évidence à ce moment-là aussi que la partie 5' des ARNs messagers peut prendre des structures alternatives selon la présence de métabolites, de métaux etc. et réguler ainsi l'expression de gènes codant pour des protéines. Ces éléments régulateurs ont été appelés « riboswitches ». Nos travaux récents ont montré que ces riboswitches ne régulent pas exclusivement des ARNs messagers. Ils peuvent aussi réguler des ARNs non codant, menant à une sophistication des régulations et une intégration des signaux jamais imaginée, il y a cinquante ans !

Enfin comme il sera présenté par E. Charpentier, les bactéries ont un système de défense immunitaire appelé CRISPR qui passe par la production d'un long ARN qui est ensuite mûri en petits ARNs qui ciblent les envahisseurs viraux ou phagiques et les inactivent. Chez la bactérie *Listeria*, l'un de ces systèmes CRISPRs est mûri par la PNPase, l'enzyme découverte par Marianne Manago.

En conclusion, c'est à une véritable révolution de l'ARN que nous assistons !



ARN et hérédité non mendélienne chez la paramécie

Eric MEYER

L'hérédité non mendélienne des types sexuels de la paramécie est l'un des plus anciens cas de ce que l'on appelle aujourd'hui l'hérédité épigénétique trans-générationnelle. Bien que les deux types sexuels de l'espèce *Paramecium tetraurelia* (O pour 'Odd' et E pour 'Even') ne soient pas génétiquement déterminés dans le génome du micronoyau germinale, ils sont néanmoins transmis entre générations sexuelles, suivant une hérédité cytoplasmique. A chaque génération, un nouveau macronoyau somatique se développe à partir d'une copie du noyau zygotique formé par la fécondation (une particularité commune à tous les ciliés); au cours de son développement, le macronoyau zygotique devient irréversiblement déterminé pour le même type sexuel que le macronoyau maternel, toujours présent dans le cytoplasme à ce stade.

L'identification récente des gènes impliqués dans l'expression du type sexuel chez plusieurs espèces jumelles du complexe *P. aurelia* a montré que le contrôle épigénétique exercé par le macronoyau maternel est véhiculé par une classe particulière de petits ARN, les scnARN. Ceux-ci ont pour fonction première de réguler les réarrangements programmés du génome qui surviennent au cours du développement macronucléaire, en permettant la reconnaissance et l'élimination des éléments transposables présents dans le génome germinale, ainsi que des IES (Internal Eliminated Sequences), séquences uniques dérivant d'anciennes insertions de transposons et qui sont précisément excisées, telles des introns d'ADN, pour reconstituer des gènes fonctionnels dans le macronoyau. Spécifiquement produits lors de la méiose du micronoyau par la totalité du génome germinale, les scnARN sont d'abord importés dans le macronoyau maternel, où ils sondent le génome somatique réarrangé à la génération précédente; seuls ceux n'y trouvant pas de séquence homologue seront ensuite réexportés vers le macronoyau zygotique en développement, où ils permettront le ciblage de la machinerie d'excision vers les séquences à éliminer, via la déposition de modifications épigénétiques. Ce processus de soustraction génomique définit de manière très conservatrice les éléments indésirables du génome germinale comme ceux étant absents du génome somatique maternel.

De la même manière, les scnARN permettent au macronoyau zygotique de reproduire des réarrangements alternatifs de gènes impliqués dans l'expression des types sexuels. L'évolution parallèle de mécanismes similaires, mais ciblant des gènes différents, dans différentes espèces jumelles montre que la voie des scnARN peut facilement être co-optée pour permettre la régulation de gènes cellulaires, et l'hérédité épigénétique de caractères différenciés, dans des populations de cellules génétiquement identiques.



CRISPR/Cas9 : une révolution dans le génie génétique

Emmanuelle CHARPENTIER

CRISPR-Cas9 has recently emerged as a powerful and universal technology for gene editing with wide-ranging implications across biology and medicine. The technology functions as molecular scissors to perform precise surgery on genes and various versions of the system have been developed to broaden its range of applications to manipulate genes and their expression in a large variety of cells and organisms. CRISPR-Cas9 has quickly been adopted by the community of biologists around the world and is now recognized as a transformative technology in various fields of research with great potential to benefit the understanding and treatment of human genetic diseases, cancers or infectious diseases.

Originally, the CRISPR-Cas9 system is an ancient RNA-mediated mechanism of immunity that allows bacteria to defend themselves against their predators, e.g. the viruses of bacteria also called phages. Our research on CRISPR-Cas9 is a continuation of significant advances in the understanding of interactions between bacteria and their environment that have resulted in a large exploitation of bacteria and their mechanisms by humans. Bacteria have revolutionized molecular biology as an unlimited source of enzymes and they are extensively used in industry in various ways (for example, as probiotics, for the manufacture of dairy products, production of biological substances such as enzymes, vaccines, antibiotics and biofuels). Most bacteria are harmless or even beneficial but several are pathogenic. This is the case of *Streptococcus pyogenes*, the source of the CRISPR-Cas9 technology. *S. pyogenes* also known as Group A streptococcus is a bacterial pathogen responsible for a wide range of human diseases including necrotizing fasciitis, commonly known as the flesh eating disease.

When examining the unique so-called CRISPR-Cas9 defence system of *S. pyogenes*, we noted that it uses a duplex of two small RNA molecules (tracrRNA-crRNA) that contain sections of the virus genome (or CRISPR) and thus carry the memory of a previous attack. We furthermore identified that this duplex of RNAs acted as the guide for a protein (Cas9) that kills the virus by cleaving its genome at specific points defined by the sequence of the memorized viral component of the RNA duplex. We exploited this function to harness CRISPR-Cas9 as a “genetic scalpel” that has now extensively been developed to allow various kinds of precise manipulation of genes and their expression with various implications in the fields of biotechnology and biomedicine.



Bioinformatique des ARN

Christine GASPIN

Les avancées formidables dans les capacités des nouvelles technologies à proposer de nouvelles méthodes d'investigation du Vivant ont conduit ces dernières années à une accélération sans précédent dans l'acquisition de volumes considérables de données. Les changements d'échelle qui accompagnent ces évolutions ont ouvert de nouvelles perspectives non seulement pour accéder au catalogue complet des « composants » du vivant et à sa diversité mais suscitent aussi de nouveaux espoirs pour comprendre et modéliser les mécanismes régissant les systèmes biologiques dans toute leur complexité. En parallèle de ces avancées, le développement de nouvelles méthodes bioinformatiques a accompagné l'analyse à grande échelle des données produites, et a contribué à révéler l'existence d'une multitude d'ARN dont les quantités et diversité continuent d'interpeller la communauté scientifique quant à leur fonction, leur structure, leur conservation et leur évolution.

Dans le cadre de cette présentation, nous présenterons quelques-unes des ressources informatiques incontournables (modèles, méthodes, bases de données) pour accompagner l'analyse des ARN codant et non codant. Nous présenterons les principes et les évolutions des méthodes de prédiction des structures secondaires de ces molécules. Nous montrerons en quoi les contraintes implicites à la structure secondaire d'un ARN sont à l'origine de l'efficacité de sa prédiction mais aussi en quoi la connaissance de la structure secondaire est centrale à l'identification *in silico* de nouveaux membres d'une famille, à l'élaboration d'un modèle tertiaire, et à la compréhension de ses modes d'action, notamment dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliquant des interactions ARN-ARN.

A la lumière des capacités d'investigation offertes par les nouvelles technologies d'acquisition de données, des nouvelles applications rendues possibles mais aussi des volumes considérables de données générés, nous poserons les défis anciens et nouveaux qu'il faudra relever en bioinformatique pour accompagner les recherches visant à élucider les mécanismes régissant les nombreuses fonctions associées à ces molécules.



Les multiples fonctions des ARN bactériens: communication, adaptation, défense et virulence

Pascale ROMBY

Les bactéries ont développé de multiples stratégies pour adapter, coordonner et reprogrammer l'expression des gènes en réponse aux changements de l'environnement ou à des besoins spécifiques à un stade donné de leur cycle de vie. Le modèle général de la régulation des gènes au niveau transcriptionnel par F. Jacob et J. Monod, a orienté, à juste titre, les recherches vers l'analyse des régulateurs des protéines contrôlant la transcription. L'une des contributions de Marianne Grunberg-Manago et de son équipe a été de montrer que l'ARNm est aussi la cible de nombreux régulateurs (protéines, ARN), qui confèrent à la bactérie la faculté d'intégrer de multiples signaux, et d'adapter rapidement sa croissance et son métabolisme. Plus récemment, l'utilisation des approches de séquençage haut débit a révélé l'existence insoupçonnée d'un grand nombre d'ARN non codant dont la fonction demeure encore inconnue. Au cours de cet exposé, je présenterai quelques exemples, principalement chez *Staphylococcus aureus*, qui montrent que ces ARN sont des composants importants des réseaux de régulation qui conduisent à la production des facteurs de virulence et qui permettent à la bactérie de survivre, proliférer ou persister dans l'hôte. L'explosion des techniques de plus en plus sensibles devrait aider à faire progresser nos connaissances sur la biologie de l'ARN pour explorer de nouvelles fonctions, comme l'implication des ARN dans la communication entre cellules au sein d'une population monoclonale, hétérogène (biofilm), ou du microbiome et leur influence potentielle sur l'expression des gènes de l'hôte.



Biogenèse et fonctions des petits ARN dont les gènes sont régulés par l'empreinte génomique parentale

Jérôme CAVAILLE

Au cours de cette dernière décennie, de nombreux travaux ont mis en avant un nombre toujours croissant de molécules d'ARN qui, contrairement aux ARNm, ne sont pas directement impliquées dans la synthèse protéique. En d'autres termes, ces ARN sont dépourvus d'information génétique capable de coder pour des protéines. On parle d'ARN non-codants (ARNnc) dont la complexité du répertoire égale voire dépasse celle des ARNm. Bien que la fonction biologique de la grande majorité des ARNnc demeure largement énigmatique, certains d'entre eux fonctionnent comme des régulateurs du flux de l'information génétique en contrôlant la structure de la chromatine, la régulation de la transcription, la stabilité des ARNm ainsi que la production et l'activité des protéines.

Les microARN et les snoARN C/D sont parmi les ARNnc les mieux caractérisés à ce jour. Ces petits ARNnc interagissent de manière sélective avec d'autres ARN via des appariements de bases et modifient leurs réactivités. Les microARN bloquent la traduction des ARNm-cibles alors que les snoARN C/D guident la formation de modifications chimiques (addition de groupement méthyles) sur des positions précises le long des ARN-cibles. L'activité de recherche de notre équipe concerne une sous-classe de microARN et de snoARN C/D dont l'expression des gènes défie les lois classiques de l'hérédité. En effet, bien que les gènes de ces petits ARNnc soient présents en deux exemplaires dans chaque noyau (un allèle hérité du père, l'autre de la mère), seule une des deux copies est active, et ce, strictement en fonction de son origine parentale. Par exemple, pour un gène donné c'est toujours la copie d'origine paternelle qui est active alors que la copie d'origine maternelle, qui peut être génétiquement identique, est mise sous silence. Il existe donc une «mémoire cellulaire» capable de distinguer l'origine parentale des allèles mais aussi de modifier leur activité. De tels phénomènes épigénétiques sont regroupés sous le terme d'empreinte génomique parentale.

Au cours de cet exposé, je présenterai une synthèse de notre compréhension de la production et du mode d'action de ces petits ARNnc atypiques, notamment en décrivant un travail qui vise à élucider la fonction physiologique de nombreux microARN via l'étude d'un modèle murin «knock-out». Enfin, je discuterai l'hypothèse selon laquelle des dérégulations de l'expression de certains snoARN C/D contribuent à l'étiologie d'une maladie humaine rare: le syndrome de Prader-Willi.