

Les diatomées bleues du genre *Haslea*, nouveau modèle d'étude des mécanismes épigénétiques chez les microalgues

L'épigénétique désigne l'ensemble des mécanismes moléculaires régulant l'expression des gènes et n'altérant pas les séquences nucléotidiques, potentiellement réversibles et transmissibles d'une génération à l'autre. En effet, il a été démontré que certains de ces mécanismes indépendants des séquences nucléotidiques pouvaient être transmis à la descendance (Heard *et al.*, 2014). Les mécanismes épigénétiques parmi les plus étudiés sont les modifications post-traductionnelles des histones, les processus de méthylation/déméthylation de l'ADN, l'expression des ARNs non-codants, ainsi que l'influence des éléments mobiles du génome. Ces mécanismes se caractérisent par leur rapidité et leur réversibilité, pouvant répondre immédiatement à des changements environnementaux ou des stress causés par des polluants tels que des métaux ou des pesticides. En deçà de la question plus fondamentale de l'évolution des génomes, l'étude des mécanismes épigénétiques permet donc de mieux appréhender les effets anthropogéniques de l'homme sur l'environnement et les organismes vivants.

A la base des réseaux trophiques, le phytoplancton eucaryote est fortement influencé par les paramètres environnementaux. En particulier, les diatomées représentent un groupe particulièrement diversifié possédant quasiment tous les composants de la machinerie épigénétique connue chez les eucaryotes (Maumus *et al.*, 2011). Leur génome présente l'unique caractéristique d'être régulé par des processus de modification de la chromatine typique des génomes de plante et d'animaux. Ainsi, de nombreux mécanismes épigénétiques décrits notamment dans l'espèce modèle *Phaeodactylum tricornutum* ont révolutionné les connaissances actuelles (Tirichine *et al.*, 2017). Cependant, ce modèle présente l'inconvénient majeur de n'avoir jamais exhibé de reproduction sexuée, ce qui est un frein pour la compréhension de certains mécanismes épigénétiques, notamment de la transmission à la génération suivante. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouveau modèle pour l'étude des mécanismes épigénétiques chez les microalgues.

La diatomée *Haslea ostrearia* est une microalgue marine connue pour sa capacité à produire un pigment bleu hydrosoluble nommé marennine, responsable du phénomène de verdissement des huîtres affinées dans les claires ostréicoles de l'Ouest de la France. La synthèse de la marennine par *H. ostrearia* et son relargage dans le milieu sont sous la

dépendance de plusieurs facteurs, en particulier celui de la lumière (Robert *et al.*, 2002; Mouget *et al.*, 2005; Prasetya *et al.*, 2016). La physiologie d'*H. ostrearia* a été étudiée, en particulier ses réponses à des changements quantitatifs et qualitatifs de l'éclairement (Mouget *et al.*, 1999; 2004), ainsi que son cycle de vie et sa reproduction sexuée (Mouget *et al.*, 2009 ; Davidovich *et al.*, 2009). Ces travaux ont permis de démontrer que l'auxosporulation chez *H. ostrearia*, comme chez de nombreuses diatomées pennées, dépend de l'atteinte d'un seuil de taille (50% de la taille spécifique maximale) et de la compatibilité entre deux partenaires (reproduction hétérothallique), mais qu'elle est également sous le contrôle de la lumière (qualité, intensité, photopériode).

Le laboratoire MMS maintient en culture plusieurs espèces d'*Haslea* bleues, et pour certaines d'entre elles, de populations d'origine géographique différente, ainsi que de couples sexuellement compatibles, ce qui permet de disposer de plusieurs générations. Le génome de certaines de ces espèces/souches d'*Haslea* bleues a été séquencé, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes épigénétiques chez les microalgues. De plus, des travaux préliminaires (non publiés) issus d'une collaboration entre Le Mans Université et l'INSERM ont permis de mettre en évidence l'existence de processus de déméthylation de l'ADN chez *H. ostrearia*. Ce premier résultat, qui associe le processus de déméthylation de l'ADN observé à l'existence de 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), est d'autant plus intéressant qu'à notre connaissance, aucune publication scientifique ne mentionne l'observation de 5hmC ni l'existence de processus de déméthylation active de l'ADN chez des diatomées.

L'objectif de ce travail de thèse est donc l'étude des réponses de l'épigénome de la diatomée *H. ostrearia* à différents facteurs environnementaux, en particulier le diuron, un herbicide fréquemment détecté à des concentrations élevées dans de nombreux cours d'eau et nappes d'eau souterraines de la Loire Atlantique, ainsi que différents métaux comme le cuivre, qui s'accumule dans les sols, les effluents et les baies (ex., la Baie d'Arcachon, Gamain *et al.*, 2017).

Méthodologie

Le laboratoire MMS maîtrise la culture des espèces / souches d'*Haslea* bleues, et a acquis l'expertise permettant l'étude de la reproduction sexuée. Les mécanismes épigénétiques seront donc étudiés chez des microalgues de première et deuxième génération, soumises à différentes concentrations sublétales de diuron et de métaux lourds en se basant sur les concentrations mesurées dans les baies ostréicoles ou à proximité. L'analyse des

modifications des histones et des méthylation de l'ADN ainsi que la recherche d'ARN non codants (micro ARN, ARN longs) et d'éléments transposables se fera par une approche de biologie moléculaire et de bioinformatique sur l'analyse des génomes disponibles. Ces techniques pourront être appliquées sur les cultures contrôles et/ou en présence de pesticide ou de métal, sur la première génération et les hybrides de deuxième génération. Grâce aux ressources du consortium EpiSAVMEN, ce travail de thèse pourra comporter deux parties complémentaires.

Partie I : Caractérisation des marques d'épigénèse (collaboration avec PFC, INSERM, etc.)

Au niveau des histones qui participent au compactage de l'ADN génomique et donc à l'accessibilité de certains gènes par l'ARN polymérase II lors de la transcription, la technique la plus fréquemment utilisée pour mettre en évidence les interactions entre protéines et ADN est celle d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en présence d'anticorps spécifiques des histones. En ce qui concerne la méthylation de l'ADN, qui intervient dans la régulation de l'activité transcriptionnelle, la technique de "Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)" pourra être utilisée. Cette méthode permet de distinguer le statut global de méthylation de deux individus en fonction de la carte de restriction enzymatique obtenue après digestion de l'ADN génomique des individus par des enzymes de restrictions sensibles et non sensibles à la méthylation. L'avantage de cette technique est que les fragments d'intérêt pourront être isolés du gel de polyacrylamide et séquencés. La méthylation de l'ADN pourra aussi être étudiée par des approches globales de dosage immuno-enzymatique (ELISA) en présence d'anticorps reconnaissant spécifiquement des fragments d'ADN méthylés à cibler.

Partie II : activité des ET et ARN non codants (collaboration avec N. Casse, IFREMER, etc.)

Une partie du travail de thèse concernera également les éléments transposables (ET) qui permettent une grande plasticité des génomes et interviendraient dans la co-régulation de gènes de défense (Egue *et al.* 2015), mais aussi aux ARN non codants (ncRNA), en particulier les microARN (miRNA), qui joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes par le ciblage des promoteurs et/ou l'activation de la traduction (Krol *et al.*, 2010; Place *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008) de la même façon que les siRNA (silencing). Il est également prévu de s'intéresser aux ARN non codants longs (lncRNA) qui dérivent en partie des ET (Kapusta *et al.*, 2013), mais dont le mécanisme d'action est moins bien connu. Les ET seront identifiés dans les génomes d'*H. ostrearia* grâce au pipeline PIRATE (Bertheliet *et al.*,

2018) développé en collaboration avec N. Casse et l'IFREMER. Les sites d'insertion pourront être identifiés avant et après exposition aux différents polluants et entre les générations grâce à l'analyse du séquençage haut-débit Illumina des génomes des différents échantillons. Les sites différentiels permettront de démontrer une activité de transposition de ces éléments. Enfin, l'activité de transposition de ces éléments mobiles sera corrélée avec les marques d'épigenèse caractérisées dans la partie 1. Les ARN non codants seront, quant à eux, identifiés sur des transcriptomes à venir obtenus après séquençage haut-débit.

Laboratoires d'accueil:

Mer-Molécules-Santé (MMS, EA2160), Le Mans Université

Laboratoires partenaires :

- CRCNA-INSERM U892-CNRS6299, Nantes
- Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues, IFREMER Nantes

Direction de thèse:

Jean-Luc Mouget (50%, directeur), Aurore Caruso (25%), Myriam Badawi (25%)

Responsables scientifiques:

Pierre-François Cartron (INSERM)

Nathalie Casse (MMS)

Ecole Doctorale de rattachement: ED Sciences de la Mer et du Littoral