



OFFRE DE STAGE DE MASTER 2 RECHERCHE

DEMETHYLATION ACTIVE DE L'ADN ET REGULATION EPIGENETIQUE DU DEVELOPPEMENT CHEZ L'HUÎTRE *C. gigas* : CARACTERISATION MOLECULAIRE ET APPROCHE FONCTIONNELLE CRISPR/Cas9.

1. Laboratoire d'accueil

UMR BOREA (Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques)

MNHN, CNRS 7208, UPMC, IRD 207, UNICAEN, UA

<http://www.borea.mnhn.fr>

Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, 14000 Caen, France

Responsable du Laboratoire : Pr. Pascal Sourdain (Caen)

Responsable du stage : **Dr. Guillaume RIVIERE** (<http://borea.mnhn.fr/fr/users/guillaume-riviere>)

Téléphone : 02.31.56.51.13

Fax : 02.31.56.53.46

E-mail : guillaume.riviere@unicaen.fr

Co-encadrement : Dr Aude GAUTIER, aude.gautier@unicaen.fr

Candidature dès que possible (CV + lettre de motivation)

L'UMR BOREA a pour objectif l'étude de la biologie évolutive et de l'écologie des organismes aquatiques. Il s'agit de comprendre, par une approche multidisciplinaire et intégrative, l'origine, le rôle et les mécanismes de l'évolution de la biodiversité aquatique (des molécules aux écosystèmes) et de contribuer à prédire ses réponses vis-à-vis des changements globaux, anthropiques et climatiques. Le stage se déroulera au sein de l'équipe 2 "**Reproduction et Développement des Organismes Aquatiques: Evolution, Régulations, Adaptations**" dans le cadre de l'axe thématique « **Régulation génétique et épigénétique du développement et de la reproduction** », dédié à l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement et la reproduction. Ces études se font à deux échelles d'analyse : 1) celle des gènes et des réseaux de gènes susceptibles d'intervenir dans les processus morphologiques et physiologiques ; 2) celle des mécanismes responsables de l'expression de ces gènes. Sur les deux niveaux, les facteurs environnementaux au sens large sont susceptibles d'intervenir et leur prise en compte est une composante inhérente d'un des axes transversaux de l'UMR.

2. Contexte scientifique, objectifs et approches techniques

La méthylation de l'ADN est un facteur clé du développement des Mammifères *via* son rôle dans le contrôle de l'expression des gènes et la transmission au travers des divisions cellulaires d'états transcriptionnels et donc de phénotypes différenciés (1). Chez les invertébrés modèles, comme la drosophile ou *C. elegans*, l'ADN est dépourvu de méthylation, mais l'établissement des castes chez les insectes sociaux repose sur la méthylation différentielle d'un sous ensemble de gènes (2). Des études récentes montrent que la méthylation de l'ADN est de manière surprenante un facteur clé de la régulation épigénétique du développement chez l'huître creuse *C. gigas*, un mollusque, alors que ce type de contrôle a longtemps été cantonné aux Vertébrés (3,4). Par ailleurs, un nombre croissant d'études montrent que les effets embryotoxiques des perturbations environnementales sont liés à des modifications épigénétiques qui peuvent se transmettre au fil des générations (5,6), une problématique cruciale dans un contexte de changement global et de pollution. Dans ce cadre se pose la question du contrôle du taux de méthylation de l'ADN; et notamment de la présence et du rôle d'une machinerie enzymatique de déméthylation active de l'ADN (7,8) (DNA Active Demethylation, DAD) et de sa régulation environnementale. Ceci est suggéré *in silico* comme la présence, dans le génome de *C. gigas*, d'orthologues d'acteurs de la DAD (TET1, TET2, TDG...) et par



des indices expérimentaux comme la détection de 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), un intermédiaire métabolique de la DAD.

L'objectif de ce stage est l'étude de la déméthylation active de l'ADN chez l'huître *Crassostrea gigas* et de son rôle éventuel dans la régulation épigénétique du développement. Cette étude passe par la caractérisation des profils d'expression d'orthologues des enzymes de la DAD (**études *in silico*/RT-qPCR**) et de la 5-hmC (**ELISA fluorimétrique, hMES-(q)PCR, profils de restriction**) au cours du développement (**fécondations et embryogenèse *in vitro*, extractions ADN/ARN**). En parallèle, la(es) fonction(s) de la DAD sera(ont) envisagée(s) *via* l'invalidation génique de la TET1 par édition du génome sur des stades précoces (**microinjections de constructions CRISPR/Cas9**) et investigation des phénotypes associés (**caractérisation des mutations, marqueurs moléculaires, études morphologiques**).

Ces résultats constitueront un travail pionnier et important au niveau fondamental qui ouvre de nombreuses perspectives. En effet, aucune étude à ce jour ne porte à notre connaissance sur la DAD chez un invertébré non insecte. De plus, les résultats attendus participeront à une meilleure connaissance de l'évolution de la régulation épigénétique du développement et de sa régulation. Par ailleurs, le succès d'une approche CRISPR/Cas9 chez les bivalves *in vivo* constituerait une première mondiale. Ce travail s'inscrit dans le cadre du **projet CNRS EC2CO 'GANESH'** ('Étude fonctionnelle des Gènes impliqués dans les ANomalies Embryo-larvaires chez l'Huître creuse *Crassostrea gigas* dans le cadre d'une exposition à un herbicide' – ECODYN – R. Sussarellu).

3. Profil du candidat

Le/la candidat(e) doit avoir une formation Master 2 recherche en biologie moléculaire et/ou marine. Il/elle doit montrer de la curiosité, de la persévérance et un intérêt pour l'étude de la physiologie animale, sa régulation moléculaire et le travail de laboratoire. Une expérience des techniques de base de la biologie moléculaire et des connaissances en épigénétique seraient un plus. Une expérience de recherche bibliographique et de rédaction est vivement souhaitée.

Période de stage : à partir de Janvier 2017.

Bibliographie

1. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013 ;14(3):204–20.
2. Elango N, Hunt BG, Goodisman MAD, Yi S V. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11206–11.
3. Riviere G, Wu G, Fellous A, Goux D, Sourdain P, Favrel P. DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* 2013; 15(6):739–53.
4. Saint-Carlier E, Riviere G. Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Lett* 2015; 589(13):1459–66.
5. Akcha F, Barranger A, Bachère E, Berthelin C, Piquemal D, Alonso P, et al. Effects of an environmentally relevant concentration of diuron on oyster genitors during gametogenesis: responses of early molecular and cellular markers and physiological impacts. *Env Sci Pollut Res Int*. 2016;
6. Norouzitallab P, Baruah K, Vandegheuchte M, Van Stappen G, Catania F, Vanden Bussche J, et al. Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic *Artemia* model. *FASEB J* 2014; 28(8):3552–63.
7. Perino M, Veenstra GJC. Chromatin Control of Developmental Dynamics and Plasticity. *Dev Cell*; 2016;38(6):610–20.
8. Mahfoudhi E, Secardin L, Scourzic L, Bernard O, Vainchenker W, Plo I. Propriétés et rôles biologiques des protéines TET au cours du développement et de l'hématopoïèse. *MedSci(Paris)*. 2015;31:268–74.